THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Philippe LOUGUET

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

oooooooo

Sujet de la Thèse: *Recherches sur les mécanismes des mouvements stomatiques du* Pelargonium X hortorum, *particulièrement à l'obscurité et sous l'action du gaz carbonique.*

Soutenue le 24 Juin 1971 devant la Commission d'Examen

MM. ULRICH : Président
HELLER } Examinateurs
LEMEE }

THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Philippe LOUGUET

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

oooooooo

Sujet de la Thèse: *Recherches sur les mécanismes des mouvements stomatiques du* Pelargonium X hortorum, *particulièrement à l'obscurité et sous l'action du gaz carbonique.*

Soutenue le 24 Juin 1971 devant la Commission d'Examen

MM. ULRICH : Président
HELLER } Examinateurs
LEMEE }

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MON PERE, A MA MERE, A MA FEMME.

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, je voudrais remercier toutes les personnes qui, à des titres divers, ont permis la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur R. ULRICH m'a accueilli au laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée dont il a la lourde charge d'assumer la direction scientifique et administrative afin de guider mes premiers travaux dans le cadre d'un Diplôme d'Etudes Supérieures. Il m'a ensuite témoigné sa confiance en acceptant de diriger mes recherches sur les mécanismes des mouvements stomatiques ; puis tout au long de ce travail, il m'a prodigué les conseils et les critiques qui m'ont permis de faire l'apprentissage du métier de chercheur mais aussi d'enseignant. Je le prie de bien vouloir accepter l'expression de ma profonde gratitude et de ma respectueuse admiration. Je voudrais également exprimer à Monsieur le Professeur ULRICH tout le plaisir que j'ai pris à travailler sous son autorité bienveillante.

Je remercie Monsieur le Professeur R. HELLER de l'intérêt qu'il a bien voulu manifester pour mes travaux en acceptant d'être le rapporteur de cette thèse. Sa critique minutieuse et ses nombreuses suggestions m'ont été précieuses.

Je remercie Monsieur le Professeur G. LEMEE qui, après avoir été membre du jury de mon Diplôme d'Etudes Supérieures, m'a fait l'honneur de participer au jury de ma thèse.

Ma reconnaissance va également à Monsieur P. MARCELLIN qui m'a initié aux techniques de mesure de la perméabilité des feuilles aux gaz.

Je tiens à remercier Madame BEN ABDELKADER et Madame PICARD pour leur précieuse aide technique, Madame GUILAIN pour son dévouement ainsi que tous les collègues qui m'ont apporté leur concours amical.

ooooooooooooooooo

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I. DESCRIPTION DES TECHNIQUES ET DU MATERIEL. 5

1-METHODES CLASSIQUES DE MESURE DU DEGRE D'OUVERTURE DES STOMATES "

1-1. Les méthodes d'observation directe. "

1-2. Les méthodes d'étude indirectes. 7

2- MISE AU POINT D'UNE METHODE UTILISANT LA DIFFUSION DE L'HYDROGENE A TRAVERS LES FEUILLES. 10

2-1. Application de l'"effet DEVAUX" : mise en évidence du phénomène physique. "

2-2. Dispositif permettant la mesure de la perméabilité au gaz diffusant à travers des feuilles maintenues sur pied. 11

2-3. Description de l'ensemble du dispositif expérimental 13

2-4. Conditions d'utilisation de la méthode. 15

3- MODE D'EXPRESSION QUANTITATIVE DU DEGRE D'OUVERTURE ET DE LA VITESSE DU MOUVEMENT DES STOMATES ; ETUDE CRITIQUE. 17

3-1. Revue bibliographique. 18

3-2. Choix d'un mode d'expression du degré d'ouverture des stomates. 19

3-3. Erreurs sur les mesures - Etude critique du mode d'expression du degré d'ouverture des stomates. 21

3-4. Choix du mode d'expression de la vitesse du mouvement des stomates. 24

4- LE MATERIEL VEGETAL : CHOIX, CONDITIONS DE CULTURE ET PROBLEMES PHYSIOLOGIQUES DE L'UTILISATION DE LA METHODE. 27

4-1. Choix du matériel végétal. "

4-2. Conditions de culture. "

4-3. Les problèmes physiologiques posés par l'utilisation de la méthode. "

CHAPITRE II. INFLUENCE DE LA TENEUR EN GAZ CARBONIQUE DE L'AIR SUR LE MOUVEMENT D'OUVERTURE ET DE FERMETURE DES STOMATES : MODIFICATIONS SOUS L'EFFET DE LA LUMIERE, DE LA TENEUR EN VAPEUR D'EAU DE L'ATMOSPHERE ET DE LA TEMPERATURE. 30

1- OUVERTURE ET FERMETURE STOMATIQUES PROVOQUEES PAR LES VARIATIONS DE LA TENEUR EN GAZ CARBONIQUE A L'OBSCURITE. 31

1-1. Effets de la suppression du gaz carbonique de l'air et du retour dans l'air (teneur en CO_2 0,03%). "

1-2. Effets des faibles concentrations en gaz carbonique. 33

1-3. Effets des fortes concentrations en gaz carbonique. 36

2- MODIFICATION DU MOUVEMENT DES STOMATES A LA LUMIERE. 40

2-1. Influence de la lumière sur l'ouverture des stomates en présence de CO_2 (teneur 0,03%) et en son absence. "

2-2. Etude des interactions lumière-fortes teneurs en gaz carbonique sur le mouvement des stomates. 43

3- EFFETS DE LA TENEUR EN VAPEUR D'EAU DE L'ATMOSPHERE. 45

4- EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LES VITESSES D'OUVERTURE ET DE FERMETURE DES STOMATES. 48

4-1. Conditions d'étude du rôle de la température. "

4-2. Influence des températures moyennes :(20°C, 10°C, 6°C). 52

4-3. Influence de températures plus basses et plus élevées 54

4-4. Discussion des résultats. 56

CHAPITRE III. INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE, DES TENSIONS PARTIELLES D'OXYGENE ET DES INHIBITEURS D'OXYDATION SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES A L'OBSCURITE, MOUVEMENTS ACTIFS ET PASSIFS DES STOMATES. 60

1- EFFETS D'UNE LIMITATION DES OXYDATIONS SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES DE FEUILLES MAINTENUES SUR PIED. "

1-1. Influence de l'anaérobiose. 61

1-2. Influence des faibles pressions partielles d'oxygène. 67

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549218_0024

2- EFFETS DES CONDITIONS D'OXYDATION SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES PROVOQUE PAR LA SECTION DU PETIOLE DES FEUILLES. 74

2-1. Influence de la section du pétiole sur le mouvement des stomates à l'obscurité, en aérobiose. 75

2-2. Influence de la section du pétiole sur le mouvement des stomates à l'obscurité, en anaérobiose. 76

2-3. Discussion. 77

2-4. Influence de quelques inhibiteurs du métabolisme respiratoire sur le mouvement des stomates à l'obscurité. 81

CONCLUSIONS GENERALES. 86

BIBLIOGRAPHIE. 90

ANNEXE. 100

ooooooooooooo

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES DANS CE MEMOIRE.

F_1, F_2, F_3, F_4	:	feuilles adultes de stade de développement équivalent appartenant à 4 plantes comparables 1- 2- 3- 4.
Π en cm	:	coefficient de perméabilité de la feuille aux gaz.
↓	:	une flèche dirigée vers l'axe des temps indique l'instant précis d'une intervention expérimentale.
as + CO_2 1.10^{-4}	:	fourniture d'air sec ayant une teneur en gaz carbonique de 1.10^{-4} en volume.
- CO_2	:	air ou mélange gazeux de balayage des feuilles dépourvu de gaz carbonique.
+ E	:	fourniture de lumière.
- E	:	suppression de la lumière.
H	:	heure légale = temps universel + 1 heure.

°°°°°°°°°°

INTRODUCTION

Le stomate est composé d'une paire de cellules épidermiques différenciées : les cellules stomatiques ; elles sont le plus souvent réniformes et ménagent entre elles une ouverture, l'ostiole. Les stomates peuvent modifier la grandeur de cette ouverture sous l'influence d'un ensemble de conditions externes et internes.

VON MOHL (1856) est l'un des premiers auteurs qui montrent le rôle primordial de la pression de turgescence des cellules stomatiques et des cellules épidermiques compagnes dans le mouvement des stomates.

A la fin du 19è siècle et au début du 20è siècle de nombreux auteurs dont DEVAUX (1898), F.F. BLACKMAN (1895), BROWN et ESCOMBE (1900) cherchent à élucider les mécanismes des échanges gazeux d'organes végétaux. Les lenticelles des tiges et des fruits, les stomates des feuilles sont reconnus comme les voies de passage principales des gaz diffusant de l'atmosphère dans la feuille et vice-versa. Dans le cas des feuilles le mécanisme de la régulation des échanges gazeux par les stomates suscite un ensemble d'investigations et, corrélativement, le déterminisme du mouvement des stomates est à l'origine d'une seconde ligne de recherches.

L'étude de la perméabilité aux gaz diffusant à travers la feuille est le point de départ de notre travail. DEVAUX (1898) provoque artificiellement des échanges gazeux diffusifs dans les tiges dans le but d'examiner les voies de passage des gaz. MARCELLIN (1958) retrouve des résultats comparables sur la pomme et décrit ainsi le phénomène physique :" Lorsqu'on place un organe végétal poreux et riche en air dans du gaz carbonique, on provoque des échanges diffusifs d'intensité différente entraînant des variations de pression des masses gazeuses intérieures et extérieures à l'organe végétal" (cas de mesures à volume constant). MARCELLIN lui donne le nom d'"effet DEVAUX". COME (1960) utilise l'"effet DEVAUX" dans l'étude des échanges gazeux respiratoires du marron d'Inde. Nous appliquons celui-ci à l'étude de la perméabilité des feuilles aux échanges gazeux de nature purement diffusive.

Les premiers résultats nous conduisent rapidement à la mise au point d'une méthode d'étude du mouvement des stomates utilisant la diffusion de l'hydrogène à travers les feuilles. Cette méthode nous a permis d'aborder quelques aspects de la physiologie des stomates.

Afin de préciser le cadre général dans lequel s'inscrit notre travail, nous rappelons les principales hypothèses concernant les mécanismes du mouvement des stomates.

- L'hypothèse "classique"

L'hypothèse dite classique formulée d'abord par SAYRE (1926) puis complétée par SCARTH (1932) et divers auteurs est la suivante. Le rôle de la lumière est un rôle indirect. L'abaissement de la teneur en gaz carbonique dans les espaces intercellulaires par suite de sa consommation photosynthétique provoque, puisque le gaz carbonique est un acide faible en solution, une augmentation du pH des cellules stomatiques ; celle-ci entraîne

un déplacement de l'équilibre réversible amidon $\underset{1}{\overset{2}{\rightleftharpoons}}$ sucres réducteurs dans le sens 1 car l'augmentation de pH favorise l'action d'une phosphorylase. L'apparition des sucres solubles entraîne une augmentation de la pression osmotique des cellules stomatiques, donc une entrée d'eau dans les cellules, une augmentation de la turgescence et l'ouverture des stomates. A l'obscurité l'équilibre serait déplacé en sens inverse.

Au cours des quinze dernières années un certain nombre de faits ont pu être opposés à cette théorie ; LEVITT (1967) récuse les différentes objections à l'exception d'une seule : les variations de la teneur en gaz carbonique entre 0,01 et 0,03% ne peuvent entraîner directement que des variations de quelques dixièmes d'unités pH (0,1 à 0,3), alors que les variations observées effectivement dans le suc vacuolaire seraient de 2 unités pH soit beaucoup plus. LEVITT propose donc de modifier la théorie classique en supposant que le gaz carbonique intervient dans des carboxylations aboutissant à la formation d'acides organiques qui, cette fois, permettent d'expliquer la diminution du pH lors de la fermeture des stomates,et réciproquement son augmentation lors de l'ouverture des stomates par la décarboxylation des acides organiques. LEVITT propose en outre de modifier l'équilibre entre l'amidon et les sucres réducteurs de la manière suivante : la phosphorolyse de l'amidon en présence de phosphate inorganique libère du glucose -1-phosphate ; mais il apparaît 1 mole de glucose-1-phosphate pour 1 mole de phosphate inorganique consommée, le bilan osmotique est nul. Il faut donc faire intervenir en outre une phosphatase *alcaline* qui régénère le phosphate inorganique et le glucose. Ce mécanisme entraînerait l'augmentation de la pression osmotique d'où l'ouverture des stomates. Cependant d'après les résultats connus chez les plantes il semble que, *in vivo*, la phosphorylase ne puisse pas agir réversiblement ; la synthèse d'amidon accompagnant la fermeture stomatique exigerait l'intervention d'une glycosyle-transférase ; malheureusement, le pH optimum d'action de cette enzyme est 7-8, au pH 5,5 son action est annulée ; il y a donc là une impossibilité.

Cette contradiction reflète la différence fondamentale qui existe entre les cellules stomatiques à la lumière et les cellules du parenchyme : les premières voient disparaître leur amidon alors qu'au contraire l'amidon s'accumule dans les secondes. Finalement, même améliorée, la théorie classique est actuellement dans l'impasse.

- L'hypothèse du rôle du glycolate.

Cette hypothèse a été formulée par ZELITCH (1963) ; elle a suscité des travaux très nombreux en sa faveur, et on peut dire une quantité à peu près égale lui opposant de nombreuses objections. Elle repose sur l'observation préliminaire de l'auteur que les α hydroxysulfonates de formule générale R - CHOH - SO_3H inhibiteurs connus de la glycolate-oxydase inhibent le mouvement d'ouverture des stomates. L'auteur montre un parallélisme étroit entre la teneur en acide glycolique et la possibilité de l'ouverture stomatique, le système glyoxylate-glycolate permettant la synthèse d'ATP disponible pour l'ouverture des stomates. Malheureusement, MANSFIELD (1965) et MOURAVIEFF (1966) ont vérifié que l'ouverture des stomates en air dépourvu de gaz carbonique à l'obscurité n'est pas inhibée par les α hydroxysul-

fonates. ZELITCH (1969) rétorque que le mouvement à l'obscurité procède d'un mécanisme différent qui n'est pas le mécanisme normal d'ouverture à la lumière, ce que nous discuterons plus loin.

- L'hypothèse du rôle direct de la lumière.

L'hypothèse d'une intervention directe de la lumière indépendante du gaz carbonique a été émise. Cette possibilité semble maintenant confirmée. Par contre, on ignore tout de son importance dans les conditions d'ouverture normales, ainsi que son mode d'action.

- L'hypothèse du rôle des cations.

Récemment FISCHER (1968), FISCHER et HSIAO (1968) mettent en évidence que l'ouverture des stomates de lambeaux d'épidermes flottant sur un milieu convenable est favorisée spécifiquement par l'ion K^+ dont la pénétration est directement prouvée. Selon ces auteurs, la quantité d'ions K^+ qui a pénétré dans les cellules stomatiques suffit à expliquer l'augmentation de pression osmotique des cellules stomatiques donc le degré d'ouverture des stomates. Très récemment WILLMER et MANSFIELD (1969-1970) montrent que l'ion K+ n'est pas le seul qui puisse favoriser l'ouverture des stomates, des ions monovalents tels que Na^+, favorisent également l'ouverture ; le Ca^{++} au contraire joue un rôle antagoniste. Ces auteurs concluent que ce mécanisme pourrait peut-être rendre compte de l'action directe de la lumière sur l'ouverture des stomates, indépendante de la concentration en gaz carbonique. Par contre, l'ouverture des stomates à l'obscurité et en air dépourvu de gaz carbonique ne s'accompagnerait pas de la pénétration de l'ion K^+.

Il semble donc qu'aucune de ces hypothèses ne puisse rendre compte de tous les faits observés. La lenteur des progrès de nos connaissances sur les stomates a nous semble-t-il, plusieurs causes :

1°) Il n'est pas possible actuellement d'isoler aisément les épidermes foliaires puis, dans un second temps, d'en extraire les cellules stomatiques en quantités suffisantes pour les soumettre aux recherches biochimiques.

2°) Il paraît impossible de transposer aux cellules stomatiques les résultats connus à partir de l'étude des cellules parenchymateuses. En effet, un certain nombre d'observations et d'expériences montrent que les cellules stomatiques ont un métabolisme particulier.

3°) Il existe très probablement plusieurs mécanismes des mouvements des stomates qui mettent en jeu des facteurs externes mais également endogènes.

Les directions de recherches se ramènent essentiellement aux études cytologiques et cytochimiques sur les cellules stomatiques d'une part, et

d'autre part à l'examen des modalités d'action des facteurs externes actifs sur le mouvement des stomates. Nous avons suivi cette dernière voie d'accès.

Un des problèmes fondamentaux du mécanisme des mouvements des stomates concerne le rôle des interrelations entre la lumière et la teneur en gaz carbonique des cellules. La lumière peut jouer un rôle indirect en diminuant la teneur en gaz carbonique par consommation photosynthétique. Afin de clarifier ce problème, nous avons pensé éliminer le facteur lumière et n'étudier le mouvement des stomates qu'à l'obscurité en fonction des teneurs en gaz carbonique de l'air.

A l'aide de notre méthode d'étude nous avons donc entrepris un examen du rôle des facteurs externes dans ces nouvelles conditions expérimentales.

- C H A P I T R E I -

D E S C R I P T I O N D E S T E C H N I Q U E S E T D U M A T E R I E L

1- METHODES CLASSIQUES DE MESURE DU DEGRE D'OUVERTURE DES STOMATES.

Il n'entre pas dans notre propos de dresser une liste exhaustive des nombreuses méthodes d'étude du mouvement des stomates. STALFELT (1956) et HEATH (1959) ont décrit deux revues bibliographiques auxquelles on peut se référer. Nous choisirons quelques types de méthodes fréquemment utilisées en insistant sur leurs avantages et inconvénients particuliers. Dans un premier type de méthodes on apprécie directement l'ouverture stomatique par mesure de la largeur de l'ostiole au microscope photonique ; ce sont les méthodes d'observation directe. Dans le second type on mesure l'effet du degré d'ouverture des stomates sur l'intensité de phénomènes physiques et biologiques ; ce sont les méthodes indirectes.

1-1. Les méthodes d'observation directe.

11-1. La méthode de LLOYD (1908).

111-1. Principe.

Des lambeaux épidermiques sont arrachés et les cellules sont fixées aussitôt dans l'alcool absolu. La largeur de l'ouverture est mesurée à l'aide d'un micromètre.

111-2. Avantages.

Elle est d'emploi commode. Les stomates étant fixés conservent

leur degré d'ouverture initial et peuvent être observés à loisir.

111-3. Inconvénients.

- Rôle de la fixation.

NADEL (1935-1938) compare les résultats donnés par différentes méthodes. Elle montre que la stabilité de l'ouverture n'est réalisée que dans le cas d'épidermes facilement détachables n'entraînant avec eux aucune cellule du parenchyme (une légère fermeture est cependant observée (20%). D'autre part, chez certaines espèces (*Citrus sinensis* et *Solanum tuberosum)* des mouvements après la fixation ont été observés bien que les cellules soient tuées.

- Autres inconvénients.

La variabilité du degré d'ouverture des divers stomates observés augmente lorsque les stomates se ferment. Il faut donc établir une moyenne d'ouverture. D'autre part les stomates et le lambeau d'épiderme sont tués, et la feuille est abîmée. Il est impossible de suivre les variations d'ouverture des mêmes stomates.

Afin d'éviter ces divers inconvénients, d'autres méthodes ont été décrites ; parmi celles-ci retenons la méthode de STÅLFELT (1929 a).

11-2. La méthode de STÅLFELT.

112-1. Principe.

Si l'on place une feuille intacte ou un fragment de feuille sur la platine d'un microscope il est possible de mesurer le degré d'ouverture à l'aide d'un objectif à immersion dans l'huile de paraffine.

112-2. Avantages.

Elle ne lèse pas l'épiderme et permet l'ouverture des stomates *in situ*.

112-3. Inconvénients.

Elle possède les inconvénients généraux des méthodes de mesure microscopique. De plus l'opacité de la feuille constitue un handicap pour une bonne définition de l'image. Des dispositifs spéciaux (HARTSUIJKER, 1935 et PISEK, 1935) permettent l'éclairage de la préparation par en-dessus.

11-3. La méthode par empreintes.

113-1. Principe.

On pratique un moulage externe de la surface foliaire en déposant

une couche mince d'une substance liquide capable de se solidifier rapidement et susceptible d'être arrachée pour être examinée au microscope. BUSCALIONI et POLLACCI (1901) préconisent l'emploi de collodion dissous dans l'éther sulfurique. L'éther s'évapore et la membrane de collodion est facilement retirée. Une variante moderne de cette méthode décrite par SAMPSON (1961) est utilisée par ZELITCH (1961). Une première empreinte négative de la feuille est réalisée à l'aide d'un ruban enduit de silicones et on en tire un positif à l'aide de films d'acétate de cellulose facilement examinés au microscope.

113-2. Avantages.

Elles sont d'emploi commode et permettent l'examen d'un grand nombre de stomates même dans le cas des feuilles à épiderme adhérent.

113-3. Inconvénients.

Ces méthodes sont susceptibles de perturber le degré d'ouverture des stomates (éther). Elles ne sont employées que sur des épidermes dépourvus de poils. Les stomates doivent se trouver à la surface de la feuille et on postule que l'ouverture mesurée à la surface de l'épiderme est bien l'ouverture efficace des stomates.

Conclusions.

Ces méthodes présentent dans l'ensemble l'inconvénient de ne limiter les observations et mesures qu'à un petit nombre de stomates (quelques dizaines) ce qui exige malgré tout un temps très long. Il est impossible de suivre les variations d'ouverture de mêmes stomates. Elles deviennent peu précises pour des stomates moyennement ou peu ouverts. D'autre part il n'est pas toujours facile de déterminer à quelle profondeur se fait l'ouverture efficace des stomates. Cependant il est parfois intéressant de les conserver comme méthodes de référence pour étalonner les méthodes d'étude indirectes plus commodes pour l'examen physiologique des stomates.

1-2. Les méthodes d'étude indirectes.

12-1. Les méthodes fondées sur la mesure de la transpiration.

121-1. Principe.

Sachant que les stomates jouent un rôle dans la régulation de l'intensité de la transpiration on mesure les variations de celle-ci et on établit la relation avec l'ouverture des stomates. STAHL (1894) utilise le papier imprégné au chlorure de cobalt, DARWIN (1898) une méthode hygroscopique. ALWIN (1949) décrit la méthode de "pesée rapide". Il mesure la perte de poids de feuilles ou de pièces foliaires aussitôt après le prélèvement sur la plante. Un appareil plus perfectionné a été décrit par VAN BAVEL (1965).

121-2. Avantages.

On ne détruit pas les stomates. Il est possible de mesurer les varia-

tions d'ouverture des mêmes stomates, et d'un grand nombre de ceux-ci. La méthode peut être utilisée dans les conditions naturelles (mesures écophysiologiques).

121-3. Inconvénients.

Il s'agit de relier le degré d'ouverture des stomates à l'intensité de la transpiration. Le problème est complexe car d'une part la transpiration cuticulaire perturbe la mesure et d'autre part il n'y a pas de relation linéaire entre l'intensité de la transpiration et le degré d'ouverture des stomates depuis la fermeture jusqu'à l'ouverture maximale. La transpiration est contrôlée en outre par un certain nombre de facteurs climatiques ; les stomates n'interviennent que pour une part dans sa régulation.

12-2. Les méthodes par infiltration.

Ces méthodes utilisées pour la première fois par HABERLANDT (1905) ont été décrites par MOLISCH (1912). De nombreuses modifications ont permis d'augmenter leur finesse.

122-1. Principe.

A la pression atmosphérique des liquides possédant de faibles tensions superficielles peuvent pénétrer dans la feuille par l'ouverture stomatique. La pénétration de ces substances est visible en examinant par transparence la feuille ; le liquide infiltré forme une tache translucide ; la mesure de la grandeur de l'auréole d'infiltration peut constituer dans des conditions "normalisées" une mesure du degré d'ouverture des stomates. Des mélanges de liquides ayant des pouvoir infiltrants croissants sont également utilisés. Ces méthodes exigent un étalonnage optique préalable.

122-2. Avantages.

Elles sont d'emploi commode notamment pour les mesures écophysiologiques (LEMEE, 1956).

122-3. Inconvénients.

Elles ne conviennent pas pour les feuilles possédant un système pilifère développé et une forte cuticule. D'autre part la grandeur de l'auréole d'infiltration dépend également de la structure des espaces intercellulaires. Une critique de ces méthodes a été faite par NADEL (1938).

12-3. Les méthodes porométriques.

Ce sont les méthodes de laboratoire les plus utilisées et les plus précises. On peut reconnaître deux grands types de poromètres. Dans le premier on utilise un écoulement gazeux convectif. L'appareil permet de mesurer la résistance de la feuille à un flux gazeux circulant sous une différence de pression totale ΔP. Dans le second, les divers appareils permettent de mesurer l'intensité des échanges gazeux diffusifs à travers

les feuilles.

123-1. Les poromètres à "résistance".

On regroupe sous ce terme le premier type de poromètres. Le premier poromètre a été décrit par DARWIN et PERTZ (1911). Puis GREGORY et PEARSE (1934) mettent au point un appareil amélioré ultérieurement par SPANNER et HEATH (1951) puis HEATH et RUSSEL (1951).

1231-1. Principe.

La loi de POISEUILLE-DARCY régit l'écoulement laminaire visqueux. Si l'on crée une différence de pression totale ΔP entre l'entrée et la sortie d'un capillaire, le débit Q , pour un gaz donné, est proportionnel à ΔP ; le facteur de proportionnalité s'appelle la perméabilité du capillaire, son inverse la résistance. L'appareil permet de comparer la résistance de la feuille à la résistance connue de plusieurs capillaires.

1231-2. Avantages.

Ce type de poromètre permet l'examen d'une portion importante de la surface foliaire ; les variations d'ouverture des mêmes stomates peuvent être mesurées, sans perturber dans une certaine mesure leur degré d'ouverture.

1231-3. Inconvénients.

Les améliorations successives ont permis d'éliminer un certain nombre de défauts importants des premiers poromètres. Cependant on mesure la résistance globale de la feuille : c'est-à-dire, lorsque le gaz circule (cas de feuilles amphistomatiques), la résistance des épidermes inférieurs et supérieurs plus la résistance du parenchyme. Pour une feuille hypostomatique, la résistance de l'épiderme inférieur et du parenchyme dans le sens parallèle à la surface foliaire est mesurée. L'analyse expérimentale et mathématique a permis d'apporter quelques précisions sur la valeur de la résistance stomatique (PENMAN, 1942). Ce poromètre a son maximum de sensibilité pour des stomates ouverts ; au contraire les résistances très élevées rencontrées au voisinage de la fermeture rendent les mesures très difficiles et imprécises. Enfin l'existence d'une surpression peut entraîner des modifications de la résistance des espaces intercellulaires (MEIDNER, 1955) et parfois même provoquer la fermeture de stomates peu ouverts (MILTHORPE et PENMAN, 1967). De nombreuses simplifications ont rendu possible l'utilisation de ces poromètres dans les conditions naturelles. Citons celles proposées par ALWIM (1965), STREBEYKO (1965), BIERHUIZEN, SLATYER et ROSE (1965), WEATHERLEY (1966).

123-2. Les poromètres à diffusion.

1232-1. Principe.

GREGORY et ARMSTRONG (1937) décrivent un poromètre utilisant la

Fig. 1. 1-A. Dispositif expérimental permettant la mise en évidence de l'"effet DEVAUX".

1-B. Courbe représentative de la distance parcourue par l'index d'eau en fonction du temps.

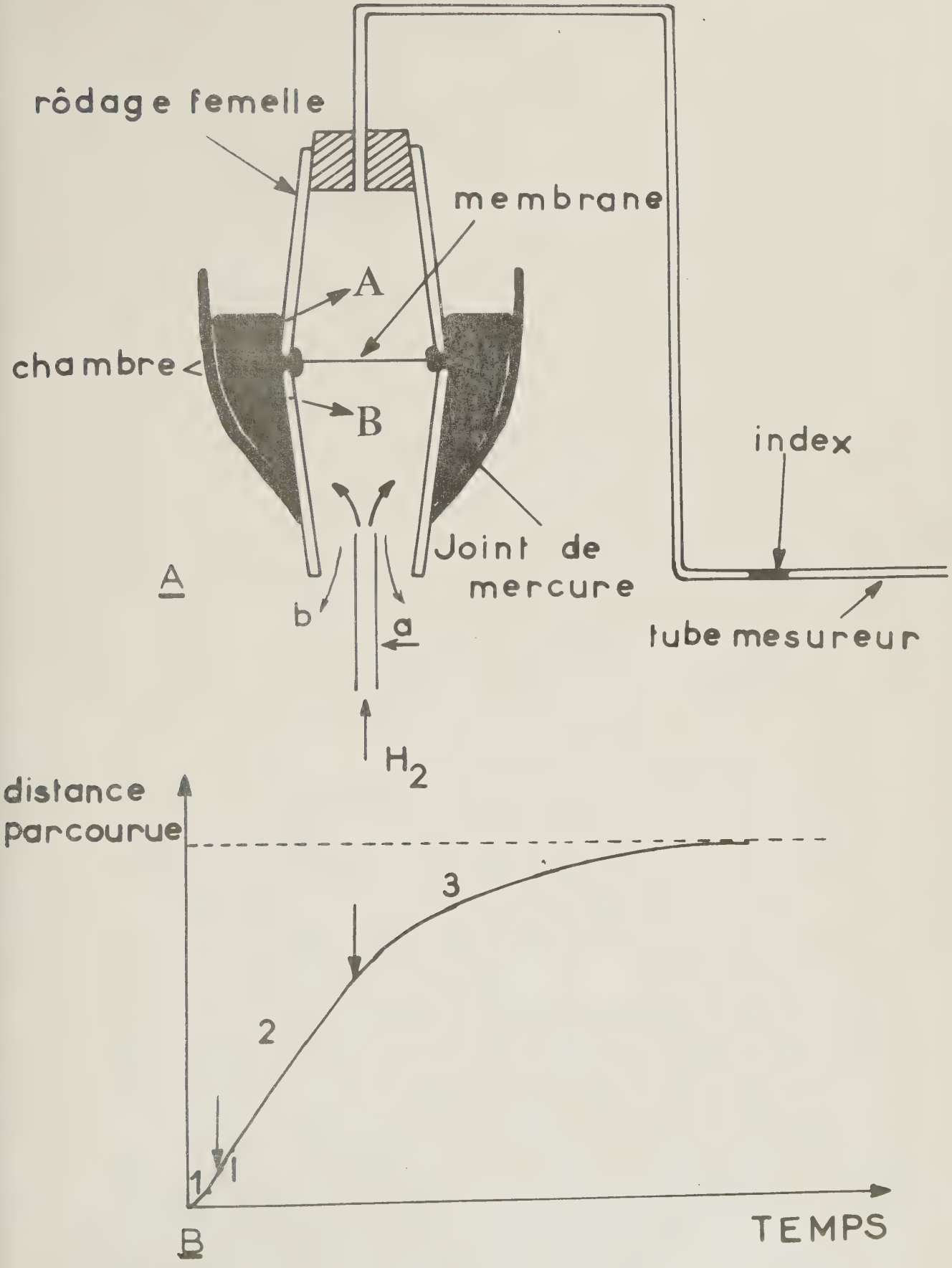

rôdage femelle
membrane
A
chambre
B
index
Joint de
mercure
A
b
a
tube mesureur
H2
distance
parcourue
3
2
1
1
B
TEMPS

Fig.1

diffusion de l'hydrogène à travers la feuille ; une version améliorée (non publiée) est décrite par HEATH (1959). A notre connaissance ce poromètre n'a pas été mentionné dans des publications concernant la physiologie des stomates. Les auteurs ont surtout cherché à étalonner les poromètres à résistance en terme de diffusion. Ceci semble dû essentiellement à à la complexité de son emploi. Nous reviendrons sur la critique de ce poromètre lors de la description de notre méthode d'étude. Récemment de nouveaux types de poromètres à diffusion ont été décrit par SLATYER et JARVIS (1966), GALE et POLJAKOFF-MAYBER (1967) et MORESHET et STANHILL (1968).

Conclusions générales concernant les méthodes d'étude.

Chacune des méthodes décrites présente des avantages et inconvénients qui autorisent et limitent leur emploi.

Si l'on veut reconnaître grossomodo des stomates ouverts et fermés, les méthodes par infiltration peuvent suffire. Si l'on veut mesurer la largeur de l'ouverture stomatique, les méthodes d'observation directe conviennent. Si l'on veut aborder les problèmes de cinétique d'ouverture et de fermeture, les méthodes porométriques sont indispensables. La meilleure méthode indirecte possible devrait établir une relation simple, si possible linéaire, entre les mesures effectuées et le degré d'ouverture des stomates d'une feuille entière. Nous nous proposons de décrire une méthode fine permettant d'examiner les problèmes de la cinétique d'ouverture et de fermeture.

2- MISE AU POINT D'UNE METHODE UTILISANT LA DIFFUSION DE L'HYDROGENE A TRAVERS LES FEUILLES.

Nous avons appliqué au cas des feuilles l'"effet DEVAUX" décrit par MARCELLIN (1958) sur la pomme Calville.

2-1. Application de l'"effet DEVAUX" : mise en évidence du phénomène physique.

21-1. Dispositif expérimental.

Plaçons une membrane poreuse inerte (membrane MILLIPORE fournie par Filter Corporation U.S.A. ; diamètre des pores 5 µ) entre deux chambres A et B (fig. 1A). L'hydrogène provenant d'une bouteille de gaz comprimé du commerce arrive par l'ajutage *a* dans la chambre B et s'échappe à l'air libre en *b*. On réalise une atmosphère pure d'hydrogène en A à la pression atmosphérique. La chambre A est en relation avec un tube de verre horizontal dans lequel glisse un index d'eau. Le déplacement de l'index dans le tube met en évidence les variations de volume à pression constante (pression atmosphérique) dans la chambre A.

21-2. Description de l'expérience.

Au temps t= 0, l'hydrogène est fourni en B. L'index se déplace vers la droite indiquant une augmentation de volume à pression constante. Portons sur un graphique la distance parcourue par l'index en fonction du temps (fig. 1 B).

21-3. Interprétation de la courbe expérimentale.

Au temps t = 0 nous avons en première approximation 100% d'hydrogène en A et 100% d'air en B. L'hydrogène diffuse plus vite que l'air à travers la membrane. L'excès de gaz apparu en B entraîne le déplacement de l'index dans le tube de mesure. La pente de la courbe est représentative de la vitesse de déplacement de l'index (V) et permet de mesurer le débit gazeux résultant (il suffit de multiplier (V) en cm mn^{-1} par l'aire de section droite du tube en cm^2).

On reconnait trois parties sur cette courbe expérimentale.

- La première (1) limitée par le point i représente la "mise en route de l'index" ; sa vitesse croît d'une valeur nulle jusqu'à une valeur maximale.

- Dans la seconde partie (2) la vitesse de déplacement de l'index est maximale et constante. Puisque le débit ne varie pas pendant ce temps tout se passe comme si la différence des pressions partielles était maintenue à son maximum 100%. La pente de cette droite est choisie pour définir la perméabilité de la membrane poreuse. Le maintien de la constance du débit gazeux dépend de la perméabilité de la membrane et des caractéristiques géométriques (volume, forme) de la chambre A, c'est le régime "pseudo-stationnaire".

- La troisième partie de la courbe (3) montre que le débit diminue et finalement s'annule (l'index s'arrête). Puisque l'hydrogène pénètre en A, sa pression partielle croît en fonction du temps et la différence des pressions partielles entre B et A diminue . Or d'après la loi de FICK le débit gazeux diffusif est proportionnel au gradient de pression partielle ou de concentration. Lorsque A est remplie d'hydrogène pur, comme il n'y a pas d'écoulement gazeux convectif (pressions totales égales de part et d'autre de la membrane), l'index s'arrête.

2-2. Dispositif permettant la mesure de la perméabilité aux gaz diffusant à travers des feuilles maintenues sur pied.

Considérons la membrane poreuse formée par une feuille amphistomatique de *Pelargonium X hortorum*. Le dispositif créé doit satisfaire au moins à deux conditions préalables:

1) Permettre la mesure de la perméabilité aux gaz d'une partie de la feuille.

2) Maintenir entre les mesures toute la feuille dans les mêmes conditions (lumière, température, teneur de l'air en gaz carbonique et en vapeur d'eau).

Le poromètre se compose de deux chambres.

Fig. 2. Chambre de mesure (A) (vue par la face inférieure) et bouchon (B) de la chambre à hydrogène (vue de dessus). Echelle 1/1.

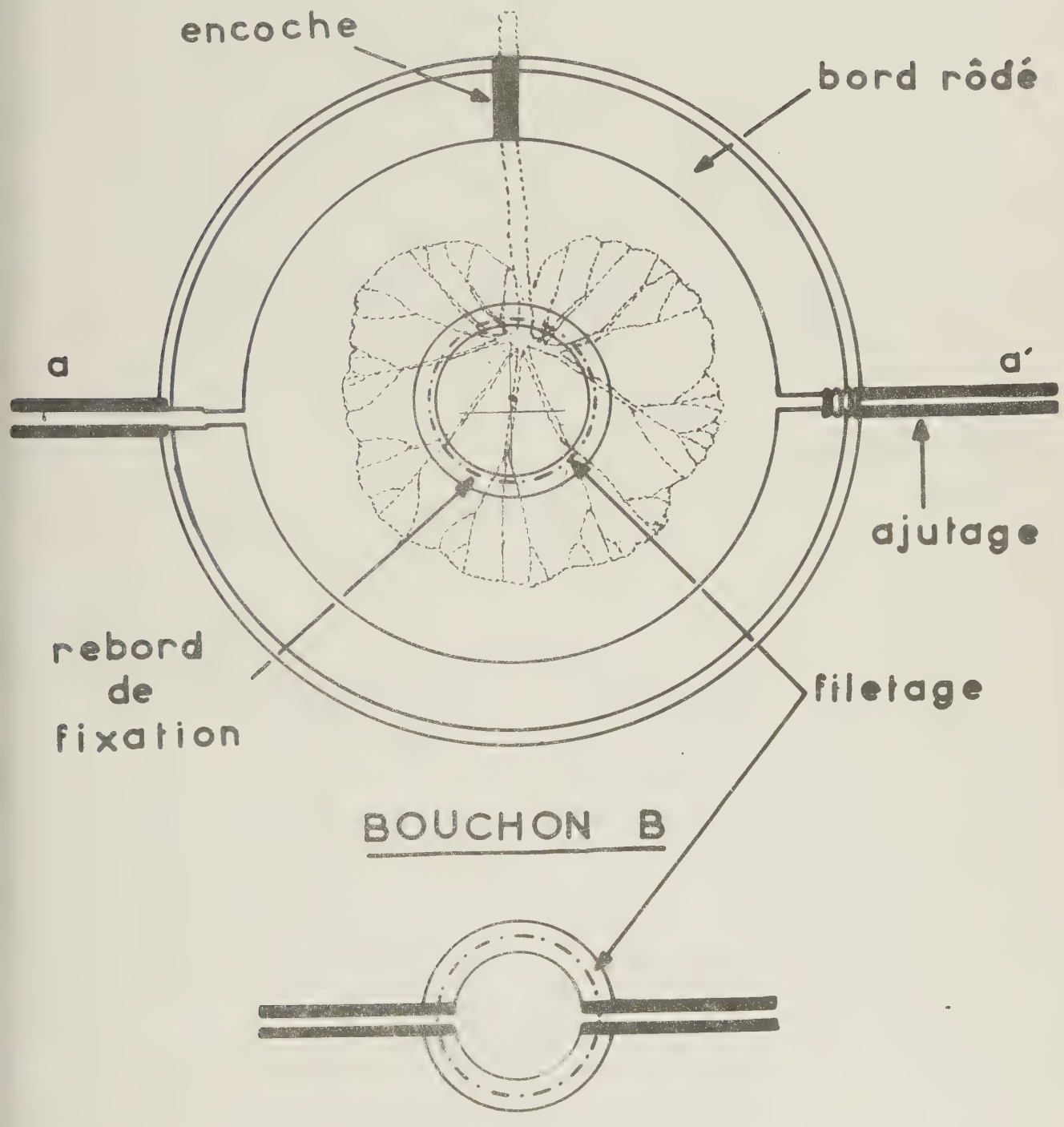
Fig. 3. Chambre de mesure (A) et bouchon (B) coupe diamétrale. Echelle 1/1.

Fig. 4. Coupe diamétrale du poromètre en place (le bouchon B est vissé sur la chambre de mesure formant la chambre à hydrogène (B). Echelle 1/1.

Fig. 5. Mise en place du joint de graisse Apiezon L et de la feuille.

CHAMBRE A (face inf.)

échelle 1 cm

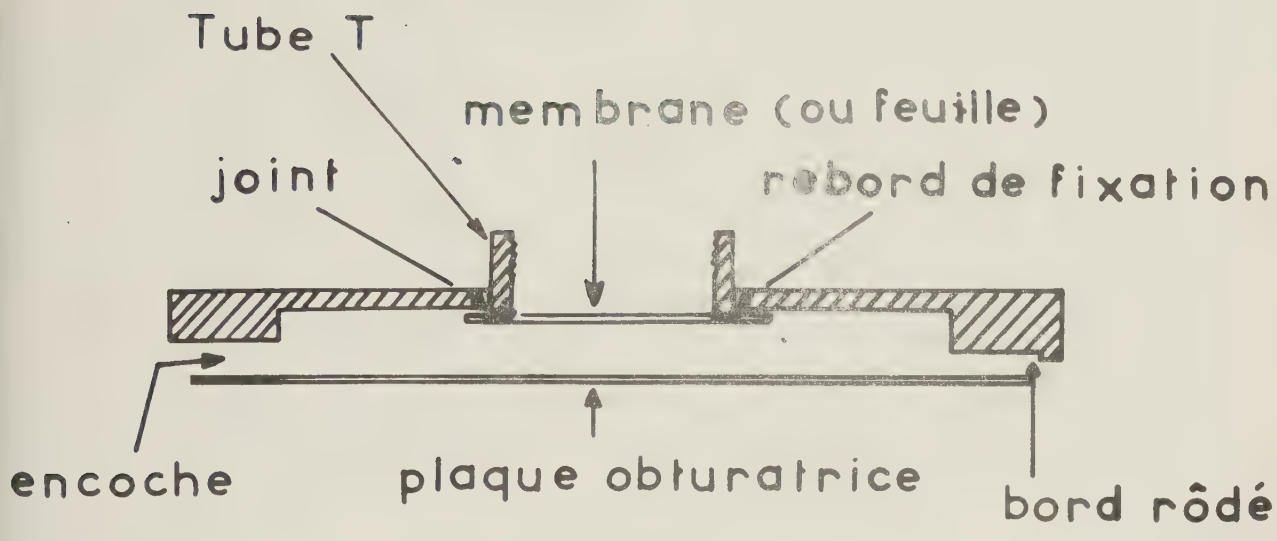


BOUCHON B

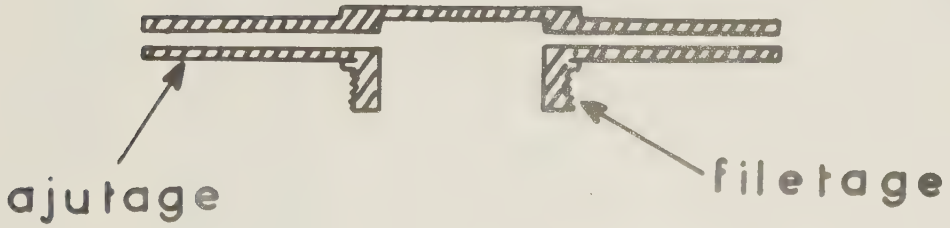
Fig. 2

COUPE DIAMETRALE

échelle 1 cm

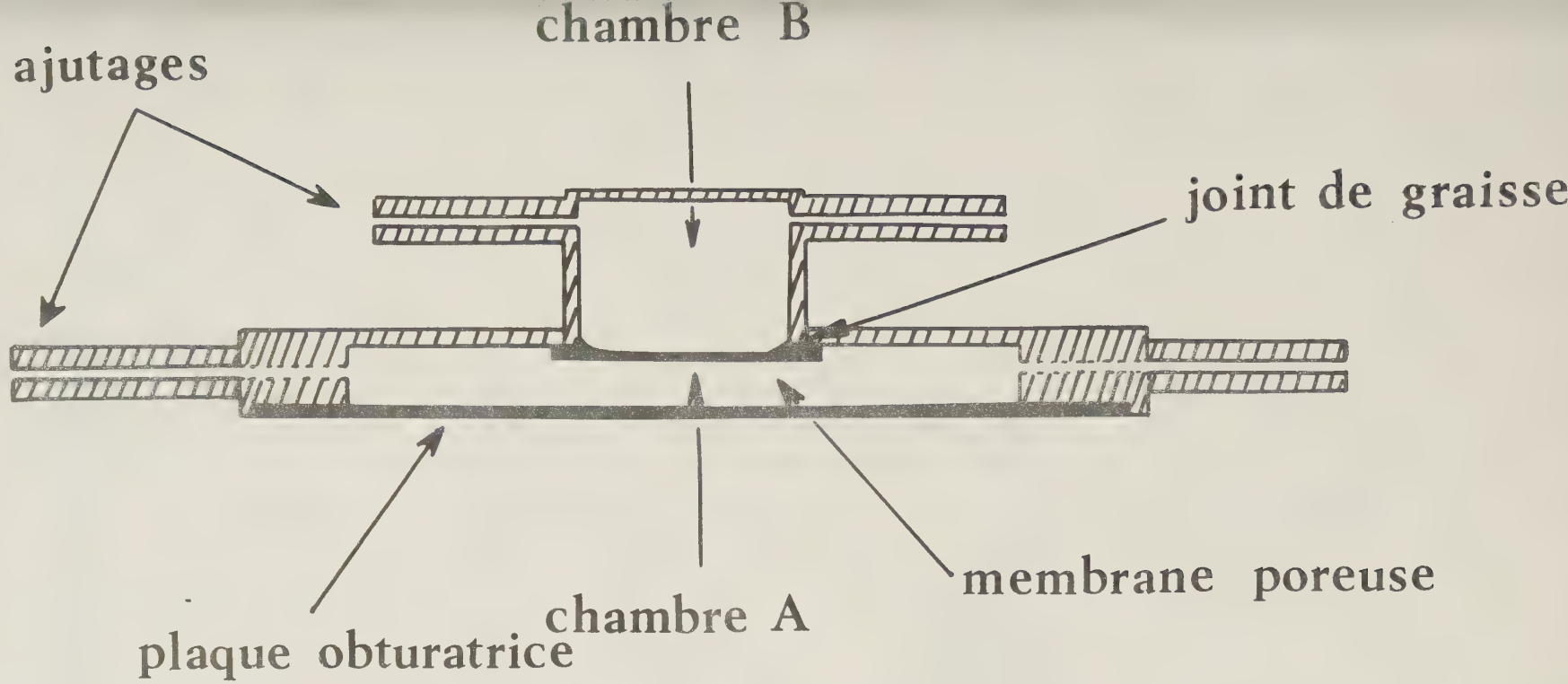


CHAMBRE A



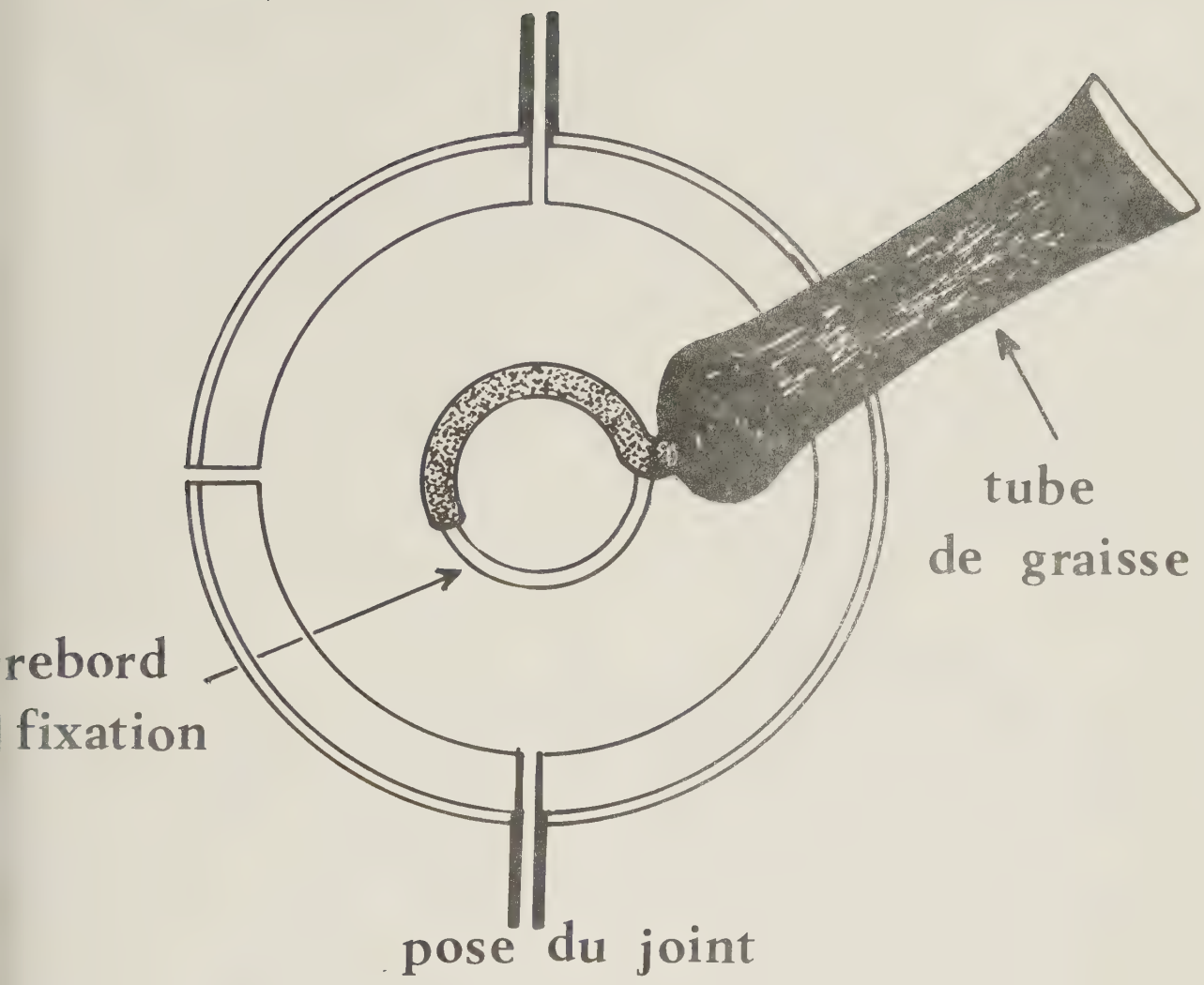
BOUCHON B

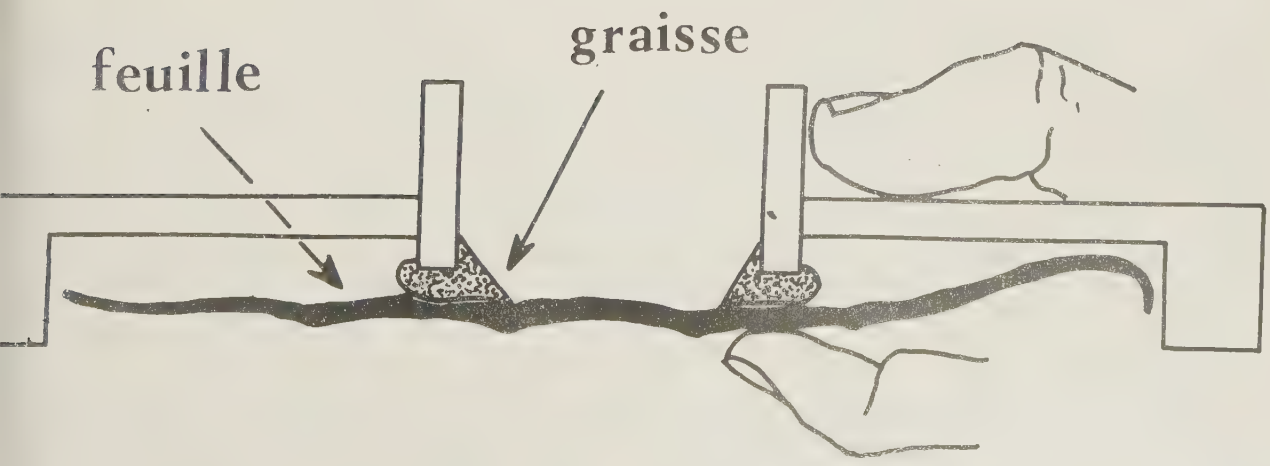
Fig. 3



Coupe diamétrale du poromètre

Fig. 4





Mise en place de la feuille

Fig. 5

22-1. Description des chambres porométriques.

La matière première utilisée doit se travailler facilement, être légère et transparente aux radiations lumineuses. Le plexiglas a été utilisé.

221-1. La chambre de mesure (A).

La feuille entière est placée dans une chambre circulaire A et reproduite sur les figures 2,3 et 4. Cette chambre est obtenue à partir d'une plaque de plexiglas convenablement évidée ; la bordure extérieure présente un nouvel évidement rôdé destiné à recevoir une mince plaque obturatrice circulaire en plexiglas qui s'y adapte parfaitement. Le pétiole de la feuille est engagé dans une encoche creusée dans la bordure.

Un tube court (T) de 3 cm de diamètre est fixé au centre de la chambre A, vers l'intérieur il présente un rebord de fixation circulaire légèrement en relief. A l'extrémité opposée, (T) présente un filetage interne grâce auquel la deuxième chambre pourra se visser. La chambre A présente en outre deux ajutages a et a' diamétralement opposés. Les ajutages permettent à la fois la circulation d'un courant gazeux dans A et la fixation de celle-ci. A a pour diamètre 10 cm, profondeur 0,7 cm et un volume interne de 55 cm^3 environ.

221-2. La chambre à hydrogène (B).

Le tube T (fig.3) peut être fermé par un bouchon de plexiglas se vissant sur lui. L'ensemble constitue la chambre à hydrogène séparée de la chambre A par la feuille. Le bouchon est muni également de deux ajutages latéraux. L'ensemble du dispositif est représenté sur la figure 4. Les chambres sont conçues pour la feuille de *Pelargonium*.

22-2. Mise en place de la feuille.

Le schéma du montage est représenté sur la figure 5. La face ventrale de la feuille est tournée vers B.

222-1. Problème du joint.

Le joint doit être rigoureusement étanche aux gaz et suffisamment résistant. Afin d'éviter toute compression des tissus foliaires nous avons préféré un joint collant la feuille aux joints par pression généralement adoptés. Les différences de pression totale entre les deux chambres sont nulles pendant la mesure et faibles pendant le balayage entre les mesures.

Il n'est donc pas nécessaire d'avoir un joint très résistant. D'autre part celui-ci doit pouvoir s'appliquer à une température compatible avec la vie de la feuille. Après bien des tâtonnements nous avons adopté la graisse APIEZON L.

222-2. Montage proprement dit.

Les chambres sont maintenues sur un support grâce à des pinces orien-

Fig. 6. Ensemble du dispositif (poromètre plus tube de mesure) en position de mesure de la perméabilité.

Fig. 7. Circuit individuel = ensemble du dispositif en position de balayage entre chaque mesure. (Les flèches indiquent la direction du flux gazeux de balayage).

SCHEMA DU MONTAGE

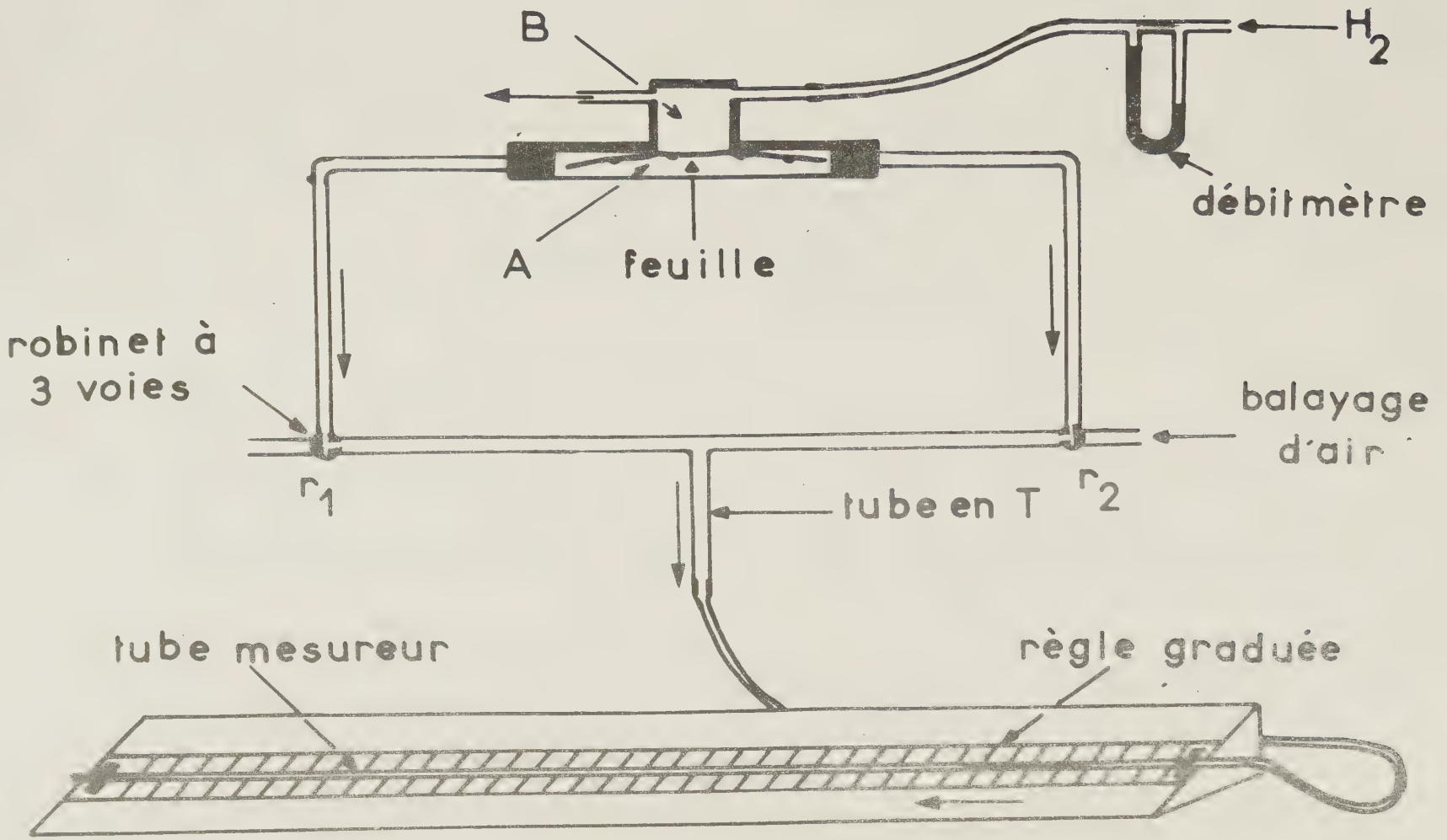
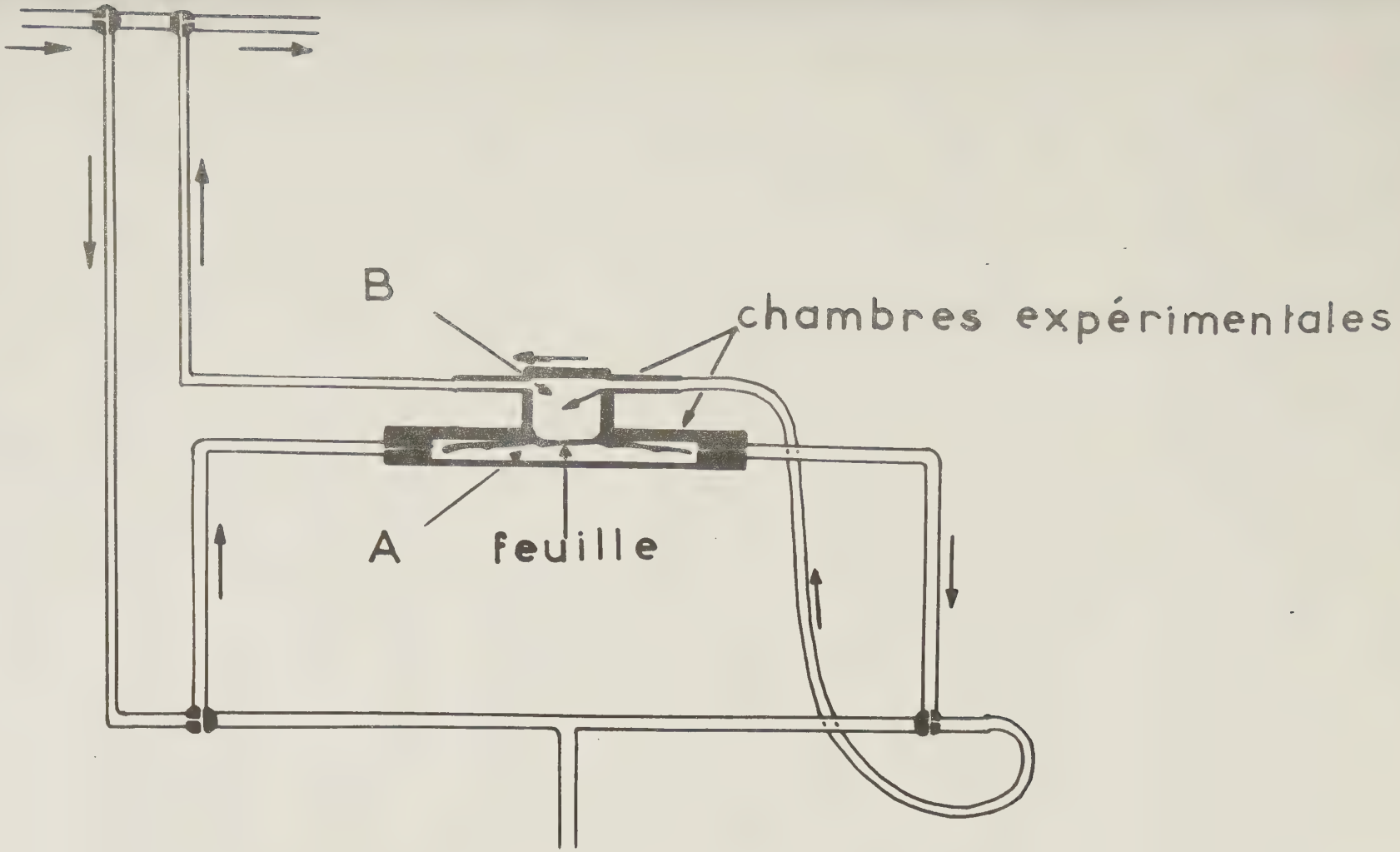


Fig.6



circuit individuel

Fig. 7

tables. La feuille destinée à l'expérimentation étant choisie, on dispose la chambre A de telle sorte qu'elle respecte la position naturelle de la feuille. Un bourrelet de graisse est disposé sur le bord intérieur de T, dans l'encoche et sur le bord circulaire rôdé. La feuille est appliquée avec précaution sur ce bourrelet ; l'étanchéité est parfaite en lissant la graisse avec une tige de verre chauffée ; puis la plaque obturatrice est appliquée sur le bord rôdé.

22-3. Réalisation de la mesure.

Pendant la mesure, B est balayée par l'hydrogène qui se dégage à l'air libre. A est relié comme le montre la figure 6 au tube de mesure horizontal muni d'un index d'eau se déplaçant devant une feuille de papier millimétrique. Une mesure se déroule en deux temps :

1) les robinets à trois voies r_1 et r_2 sont tournés dans la position du schéma. A est alors en communication avec le tube de mesure. On mesure la vitesse du déplacement de l'index à l'aide d'un chronomètre au 1/10ème de seconde.

2) les robinets r_1 et r_2 sont tournés d'un demi-tour puis on supprime la fourniture d'hydrogène. On rétablit le balayage gazeux dans les chambres A et B. Le dispositif décrit forme un circuit individuel (fig.7) qui s'intègre dans un circuit général que nous décrivons.

2-3. Description de l'ensemble du dispositif expérimental.

Ce dispositif général doit permettre le contrôle et le maintien des conditions extérieures autour des plantes.

23-1. Maintien de la température.

Nous avons fait construire une chambre isotherme dont les dimensions permettent d'expérimenter sur quatre feuilles au maximum ; la température est réglée à $\pm$ 0,5°C au centre de la chambre.

23-2. Maintien de la constance de l'éclairement.

Les expériences se sont pour la plupart déroulées à l'obscurité. Cependant les plantes doivent recevoir le minimum trophique. La lumière est dispensée par une batterie de 10 tubes luminescents munis de réflecteurs donnant un éclairement moyen à mi-hauteur de l'ordre de 3000 Lux.

23-3. Maintien du débit de balayage gazeux et de la teneur en gaz carbonique de l'air.

Dès le début de notre travail nous avons entrepris l'étude du mouvement des stomates à l'obscurité en fonction de la teneur en gaz carbonique de l'air, or celle du laboratoire est trop élevée et éminemment variable. Nous avons fabriqué nous-même l'air naturel de teneur moyenne voisine de 0,03%.

Fig. 8. Schéma du dispositif expérimental permettant la fixation du débit et de la teneur en gaz carbonique de l'air de balayage du circuit général (dans la gamme de concentration : 0 - 3.10^{-4}).

- le gaz carbonique est fourni grâce à un sachet étanche de polyéthylène souple.

. Pa : pression atmosphérique
. h : surpression réglable en amont du circuit.
. les flèches indiquent le sens de circulation du flux gazeux
. R : robinets à trois voies.

Fig. 9. Amélioration du dispositif de fourniture du gaz carbonique grâce à un tube souple de Rhodorsil.

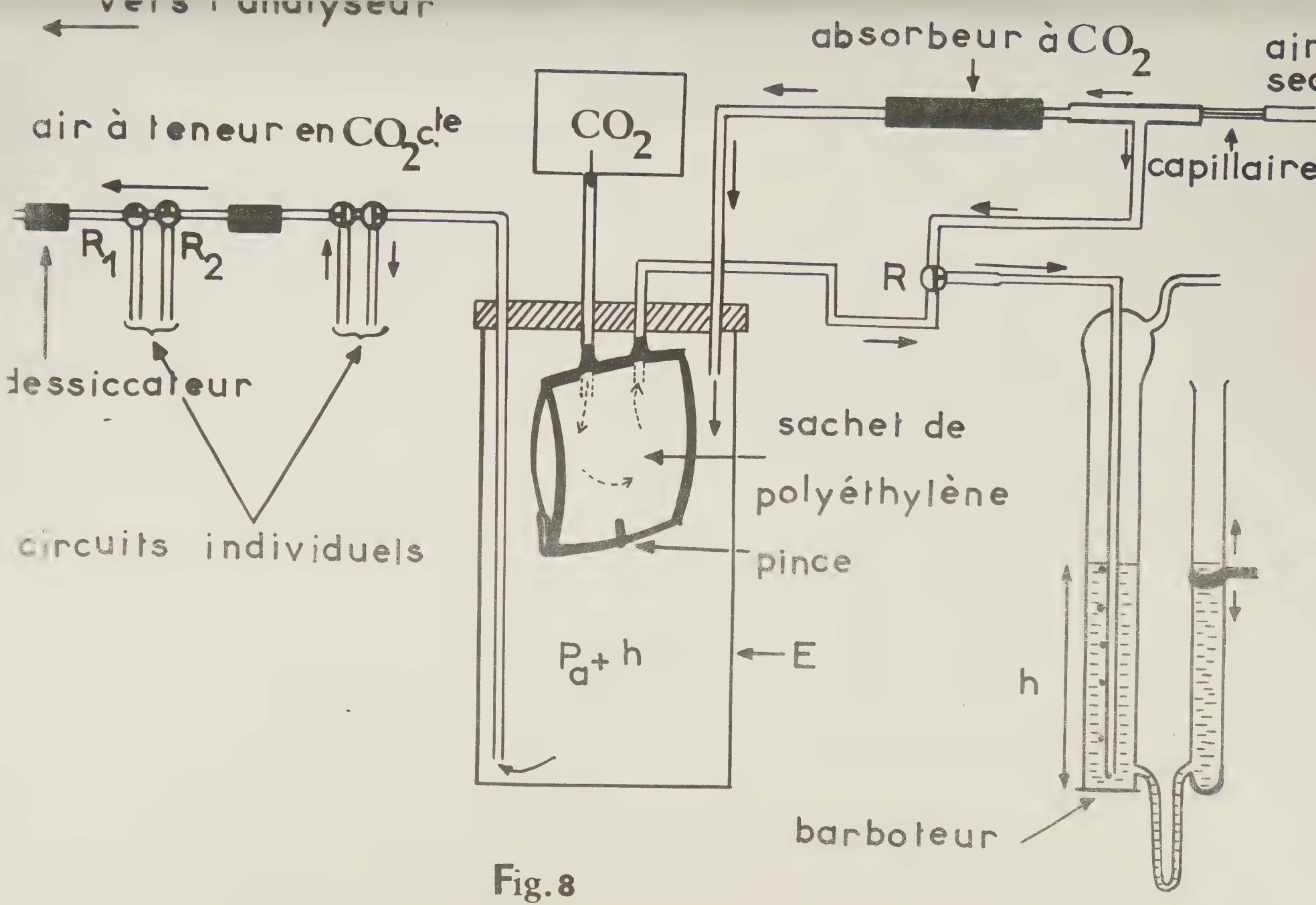

vers l'analyseur
absorbeur à CO_2
air sec
air à teneur en CO_2 c.te
CO_2
capillaire
R_1
R_2
R
dessiccateur
sachet de
polyéthylène
pince
circuits individuels
$P_a + h$
E
h
barboteur

Fig. 8

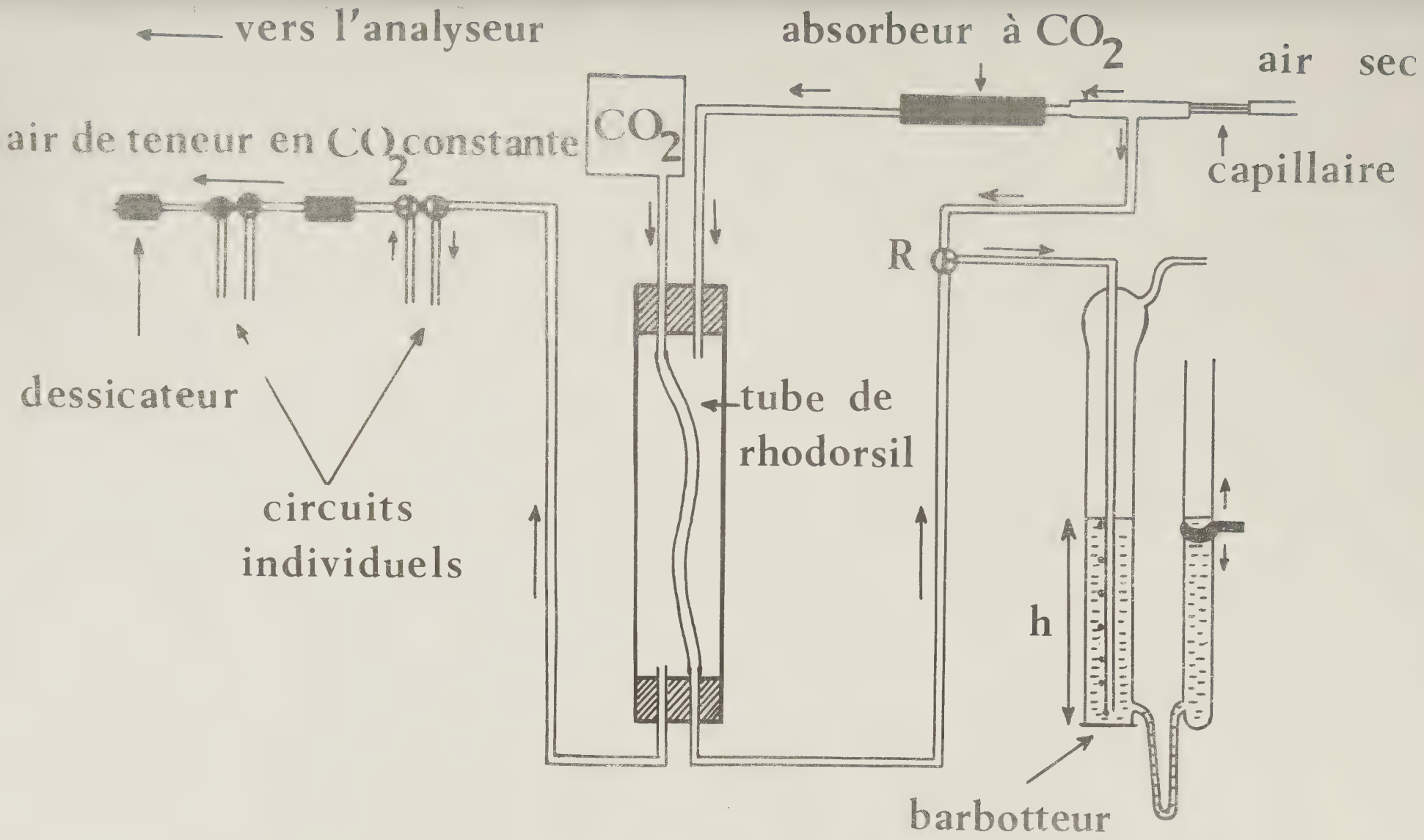

vers l'analyseur
absorbeur à CO_2
air sec
air de teneur en CO_2 constante
CO_2
capillaire
R
dessicateur
tube de
rhodorsil
circuits
individuels
h
barbotteur

Fig.9

Le dispositif expérimental comprend les circuits individuels schématisés (fig.7) dans lesquels l'air de balayage suit le sens des flèches ce qui permet le balayage des deux côtés de la feuille.

Le débit de cet air et la teneur en gaz carbonique sont déterminés au moyen du dispositif schématisé sur la figure 8.

233-1. Dispositif de réglage du débit d'air.

Le débit d'air doit être maintenu rigoureusement constant, d'une part pour permettre le maintien de la teneur en gaz carbonique de l'air, d'autre part pour maintenir les conditions de l'évaporation autour des feuilles. Le débit d'air choisi est de 40 $1.h^{-1}$. L'air sec sous pression est détendu au moyen d'un capillaire permettant un débit de 70 $1.h^{-1}$ environ. L'air en excès qui s'échappe par une fuite placée en aval du capillaire et par l'intermédiaire du robinet à trois voies R, est évacué sous une hauteur d'eau réglable h. Il est donc possible de ramener aisément le débit à 40 $1.h^{-1}$ quelles que soient les variations des pertes de charge rencontrées dans le reste du parcours.

233-2. Dispositif de réglage de la teneur en gaz carbonique de l'air.

Nous avons pensé utiliser les propriétés des films plastiques en ce qui concerne la diffusion du gaz carbonique pour l'obtention d'atmosphères pauvres en gaz carbonique (de 0 à 0,03%).

- 1er dispositif. L'air détendu est débarrassé de son gaz carbonique par passage dans un absorbeur contenant de l'ascarite (amiante sodée). Cet air s'enrichit en gaz carbonique par passage dans une enceinte E (bocal) contenant un sachet de polyéthylène de 60 µ d'épaisseur balayé intérieurement par du gaz carbonique qui diffuse à travers le film. La perméabilité au gaz carbonique de ce film est d'environ 1,2 cm^3 par cm^2 par jour pour une différence de pression partielle d'une atmosphère à 18°C. On dispose de trois moyens théoriquement pour faire varier la teneur en gaz carbonique : faire varier le débit d'air, ce qui est exclu, ou bien le pourcentage de gaz carbonique balayant l'intérieur du sachet, ou bien la surface d'échange du sachet, procédé que nous avons adopté. Le gaz carbonique qui a balayé l'intérieur du sachet est éliminé par l'intermédiaire du même robinet à trois voies R sous la hauteur d'eau h. Dans ces conditions, la surpression est la même à l'intérieur du sachet souple et à l'extérieur. Celui-ci conserve sa forme et, d'autre part, la diffusion est bien le seul mode d'écoulement gazeux possible à travers le film plastique.

- 2ème dispositif. Nous avons pu simplifier ce montage en remplaçant le sachet de polyéthylène par un tube plastique au silicone (nom commercial Rhodorsil). Ces tubes sont très perméables au gaz carbonique. Le dispositif fonctionne sur le même principe que précédemment (fig.9). Il suffit d'utiliser des tubes de longueurs différentes et la combinaison de différents systèmes peu encombrants permet d'obtenir la gamme de teneurs en gaz carbonique voulue. Ces tubes ne semblent pas vieillir et la perméabilité est restée remarquablement constante depuis plusieurs années. Le contrôle du débit de balayage et de la teneur en gaz carbonique est effectué en permanence à l'aide d'un analyseur à infra-rouge O.N.E.R.A. muni d'un gyromètre,

dont la précision est de l'ordre d'une partie pour 100.000.

L'emploi de ce dispositif et des poromètres présente quelques difficultés que nous allons résumer.

2-4. Conditions d'utilisation de la méthode.

24-1. Problème de la détermination des fuites.

Celles-ci peuvent exister au niveau du joint, dans la feuille, au niveau du pétiole et de la plaque de plexiglas. Le contrôle de l'absence de fuites doit être fréquent non seulement au moment du montage mais également au cours de l'expérimentation car certaines feuilles peuvent rester en expérience de trois semaines à un mois. Il faut déceler les fuites d'importance "moyenne". Ainsi une perforation unique provoquée par une aiguille de 300 µ empêche totalement la manifestation de l'"effet DEVAUX". Une fuite moyenne trouble l'expérience en ralentissant le déplacement de l'index. Dans ce cas il s'est toujours avéré que le balayage du bouchon B par l'air à la place de l'hydrogène entraîne un déplacement de l'index qui reste immobile en l'absence de fuites. Si la fuite existe en un autre endroit du dispositif, il suffit de mettre le tube de mesure en relation avec la chambre A et de soulever légèrement celui-ci ; en cas de fuite l'index se déplace.

24-2. Utilisation du tube de mesure.

C'est une canne de verre dont le diamètre intérieur a été choisi après examen de la perméabilité aux gaz de plusieurs feuilles (généralement 0,4 cm de diamètre). Il est nécessaire de rétablir le film d'eau en faisant glisser l'index avant chaque mesure de façon à éviter tout frottement superflu. L'eau a été adoptée car elle possède une tension superficielle suffisamment élevée qui assure la stabilité de l'index. Le ménisque choisi comme repère est évidemment celui qui limite le volume variable formé par la chambre et la portion du tube de mesure.

24-3. Emploi de l'hydrogène.

L'hydrogène utilisé peut être issu directement de la bouteille de gaz comprimé ou bien il peut être humidifié. Les mesures diffèrent dans les deux cas. La variation observée est compatible avec la diminution de pression partielle due à la pression de vapeur d'eau saturante à la température de l'expérience. Nous utilisons l'hydrogène sec. Dans ces conditions quel est le débit d'hydrogène adéquat ? quel est le temps minimum séparant deux mesures consécutives ?

243-1. Détermination du débit optimal d'H_2.

Afin d'étudier ces conditions physiques nous avons utilis

Fig. 10. Courbes représentatives des distances parcourues par l'index en fonction du temps pour différents débits d'hydrogène.

. DH_2 = débit initial d'hydrogène = 500 $cm^3.mn^{-1}$.

. D/x = fraction du débit initial.

Fig. 11. - 11A. Courbe représentative du débit gazeux circulant par diffusion à travers la membrane poreuse en fonction du débit d'hydrogène balayant la chambre B.

- 11B. Temps de mise en route de l'index d'eau en fonction du même débit.

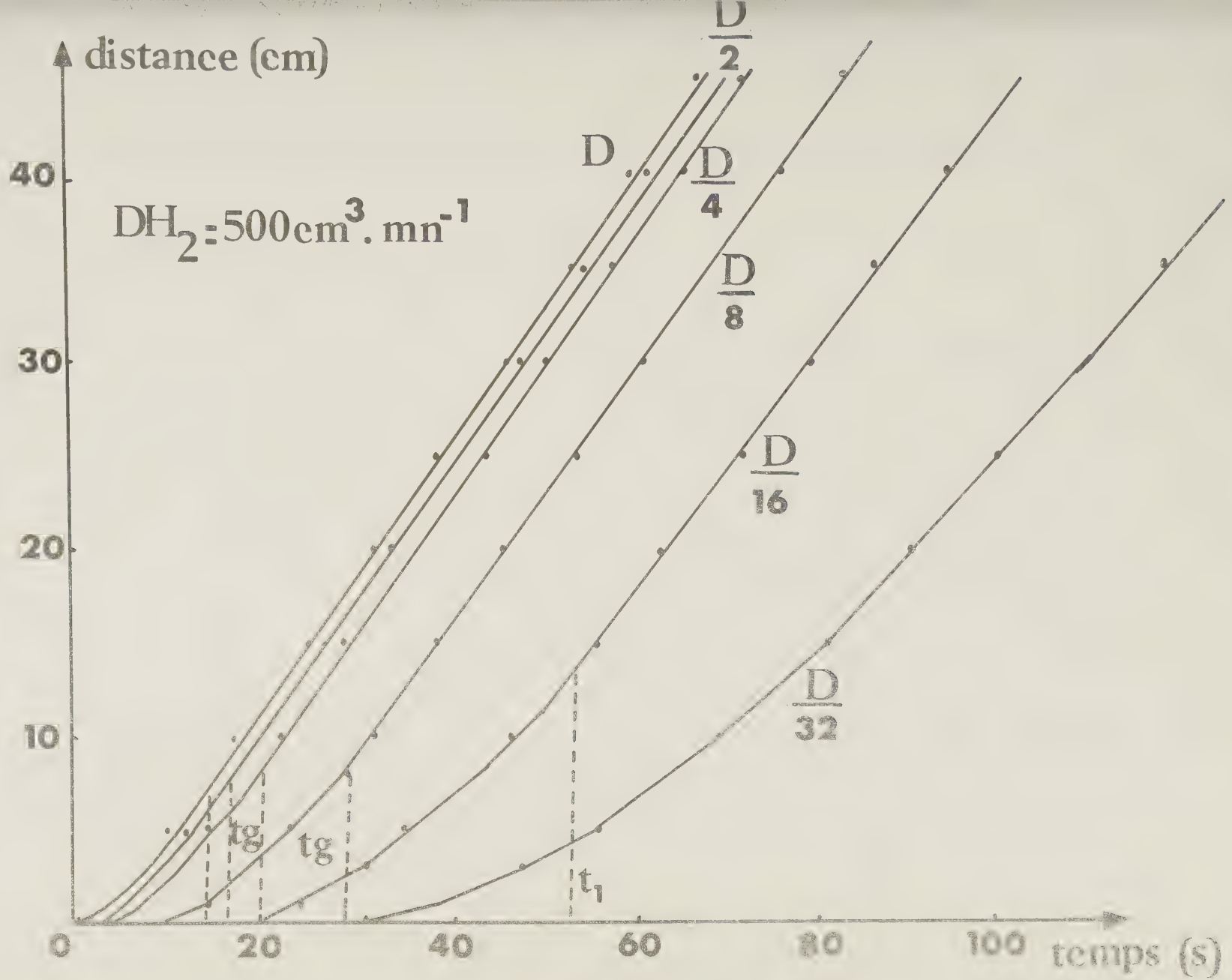

distance (cm)
40
30
20
10
0
20
40
60
80
100
temps (s)
$DH_2 = 500 cm^3 . mn^{-1}$
D
D/2
D/4
D/8
D/16
D/32
tg
tg
t_1

Fig. 10

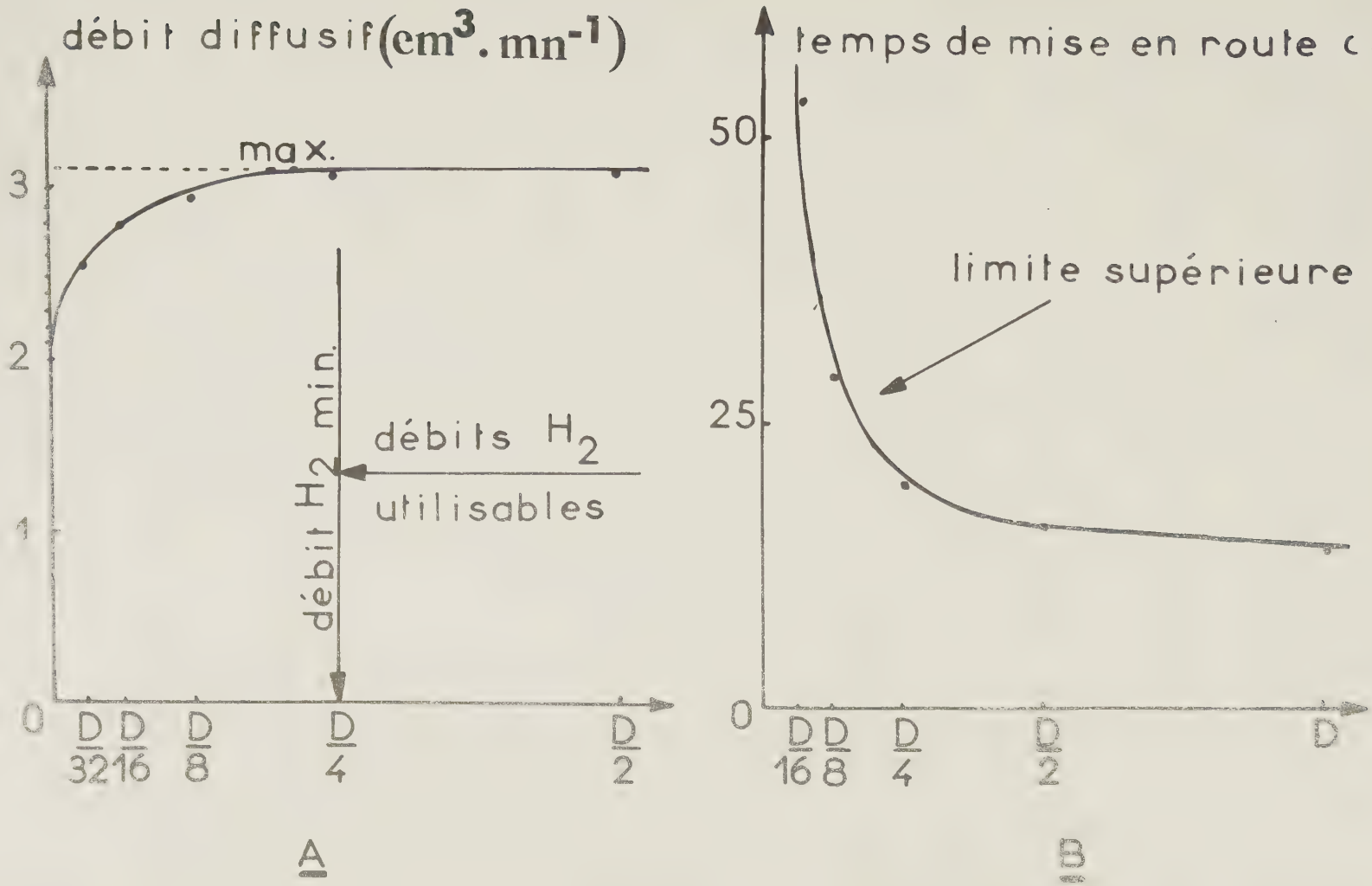

débit diffusif ($cm^3.mn^{-1}$)
max.
3
2
1
0
débit H_2 min.
débits H_2
utilisables
D/32 D/16 D/8 D/4 D/2
A
temps de mise en route (s)
50
25
0
limite supérieure
D/16 D/8 D/4 D/2 D
B

Fig.11

membrane poreuse inerte.

Mode opératoire : Le temps 0 des mesures correspond à l'instant où l'hydrogène est envoyé dans le bouchon B. Les distances parcourues par l'index en fonction du temps sont exprimées à partir de l'origine des temps pour divers débits d'hydrogène (fraction d'un débit D = 500 cm^3mn^{-1}. Les résultats ont été reportés sur la figure 10 qui révèle les faits suivants :

1) Si le débit d'hydrogène est supérieur à D/4 (125 cm^3mn^{-1}) l'index atteint une vitesse maximale constante et indépendante du débit d'hydrogène.

2) Le temps nécessaire pour que l'index atteigne sa vitesse maximale est d'autant plus court que le débit d'hydrogène est plus élevé.

La figure 11A représente les variations des débits diffusifs en fonction des débits de balayage d'hydrogène. Dans la première partie de la courbe, le débit diffusif croît en fonction des débits d'hydrogène. Dans la seconde le débit diffusif est maximum quel que soit le débit d'hydrogène. Nous pouvons considérer que le débit maximum correspond au maintien d'une atmosphère pure d'hydrogène dans la chambre B.

Considérons le temps de"mise en route" de l'index. C'est le temps nécessaire pour que l'index atteigne sa vitesse maximum pour un débit d'hydrogène déterminé. Pour déterminer ce temps on se reporte à la figure 10 ; aux temps t_1 la courbe devient linéaire, t_1 est le temps de mise en route de l'index. Sur la figure 11B les temps de mise en route sont portés en fonction des débits d'hydrogène. Pour les faibles débits t est long, l'index ne démarre pas aussitôt. Nous avons montré que les débits supérieurs à D/4 étaient utilisables (fig. 11A). La courbe montre que les temps correspondants sont de 20 s. environ et que la distance parcourue pendant ces 20 s. est de l'ordre de 10 cm. Donc lorsque l'index a parcouru 10 cm il est possible de faire la mesure. Grâce à cette étude nous réduisons le temps de passage et le débit d'hydrogène à leur minimum. Dans le cas des feuilles dont la perméabilité est généralement supérieure à celle de la membrane inerte il est nécessaire de faire la même étude. Mais comme d'autre part la perméabilité ne doit pas varier, nous avons refait les mêmes expériences sur une feuille desséchée morte dont la perméabilité est constante et supérieure aux perméabilités rencontrées dans le cas des feuilles vivantes. La diminution de la pression partielle d'hydrogène dans B entraîne une diminution du débit diffusif or l'hydrogène est fourni continuellement pendant la mesure. L'air peut pénétrer,

1) soit par l'ajutage de sortie de B à contre courant ce qui paraît peu probable (fig. 7).

2) soit par diffusion à travers la membrane poreuse ce qui est normal.

Les calculs théoriques à partir des résultats décrits (fig. 10 et 11) permettent de penser que la pollution par de l'air ne doit pas être supérieure à 1%. Pour une perméabilité quelconque mesurée par un débit d'air D à travers les feuilles il faut que le débit de balayage de B

Fig. 12 Courbe représentative du débit circulant par diffusion à travers l
membrane poreuse en fonction des temps de balayage du poromètre
par de l'air sec. Le poromètre étant initialement rempli d'hydro-
gène.

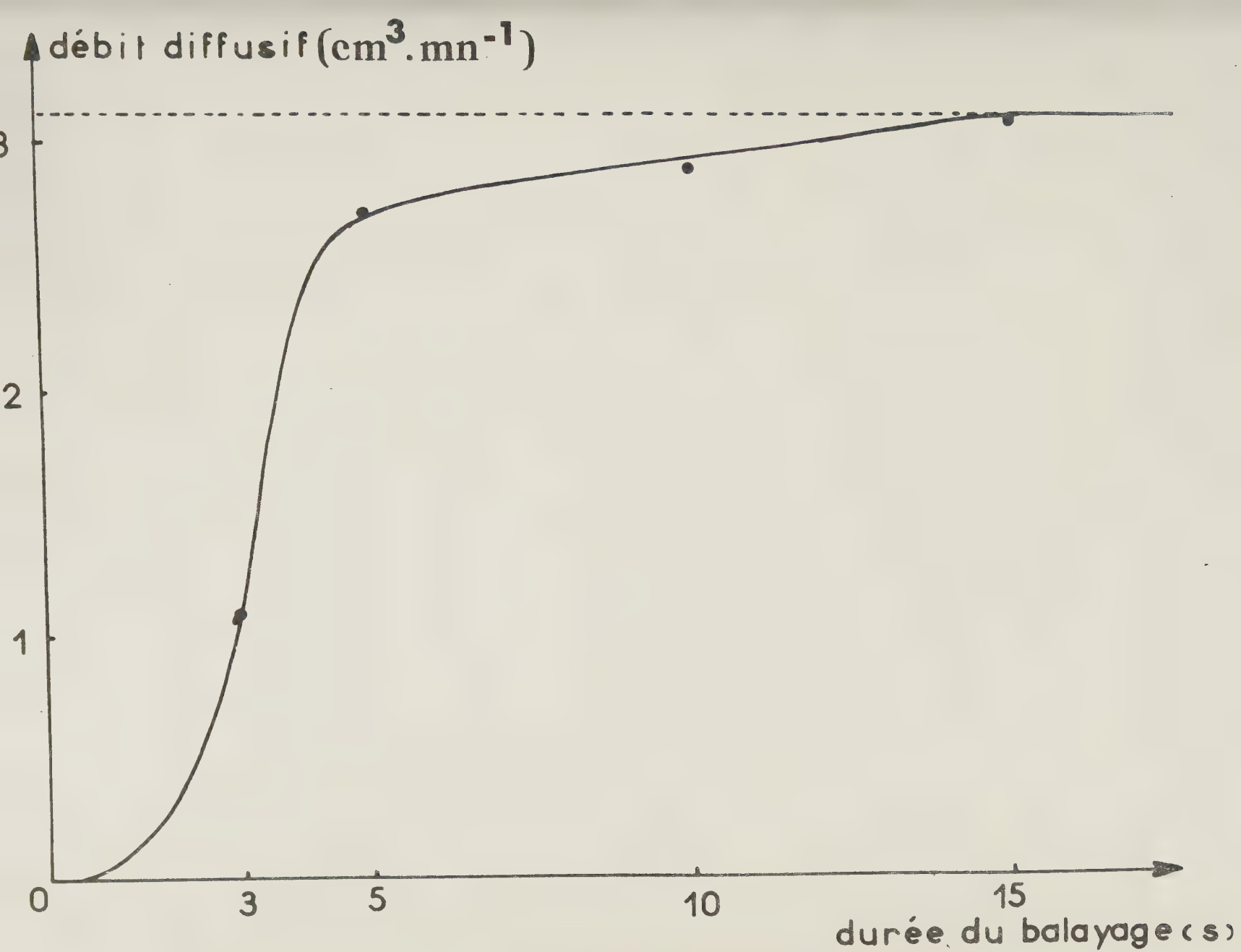


Fig. 12

par l'hydrogène soit égal ou supérieur à $\frac{D}{2,7} \times \frac{100}{1} \simeq 40\ D$.
Aux erreurs expérimentales près les résultats recoupent le calcul théorique. Nous avons employé des débits de l'ordre de 1000 $cm^3 mn^{-1}$. Dans ces conditions, les temps de mise en route sont de l'ordre de 10 s. et la distance parcourue par l'index avant la mesure est de 10 cm. Cette étude devra être réalisée toutes les fois qu'un nouveau poromètre sera utilisé.

243-2. Détermination du temps minimum séparant deux mesures.

Puisque l'hydrogène a diffusé dans la chambre A, une nouvelle mesure ne pourra être réalisée que lorsque celui-ci sera chassé par un balayage d'air normal. Nous nous sommes placés dans les conditions les plus défavorables et nous avons porté le débit diffusif en fonction du temps de balayage de la chambre A remplie au préalable par l'hydrogène. La figure 12 montre qu'un balayage de 15 s. avec un débit de 2 $l.mn^{-1}$ suffit à chasser tout l'hydrogène.

Conclusions.

Cette méthode repose sur un principe simple. Toutefois son utilisation rationnelle requiert une certaine pratique. Finalement nous apprécions le degré d'ouverture des stomates en mesurant le débit résultant de gaz diffusant à contre-courant. Peut-on définir un paramètre géométrique qui caractérise le degré d'ouverture des stomates ?

3- MODE D'EXPRESSION QUANTITATIVE DU DEGRE D'OUVERTURE ET DE LA VITESSE DU MOUVEMENT DES STOMATES ; ETUDE CRITIQUE.

Puisque nous voulons mesurer le degré d'ouverture des stomates à l'aide d'une méthode utilisant la diffusion des gaz, il est donc logique de chercher à établir les relations qui existent entre l'intensité de la diffusion des gaz et le degré d'ouverture des stomates. De nombreux auteurs ont cherché à établir ces relations ; on peut distinguer schématiquement trois directions de recherche en rapport avec les mécanismes de diffusion étudiés.

1- La première voie concerne l'étude des modalités de la diffusion des gaz et vapeur concernés dans les échanges biologiques de la plante avec l'atmosphère.

2- La seconde a été suivie par les physiciens et les biologistes qui examinent les problèmes de l'interdiffusion de deux ou plusieurs espèces moléculaires à travers les membranes poreuses.

3- La troisième qui n'est qu'un cas particulier de la précédente a permis d'examiner plus précisément les relations entre les mesures porométriques par diffusion et le degré d'ouverture des stomates.

3-1. Revue bibliographique.

31-1. Diffusion de l'oxygène, du gaz carbonique et de la vapeur d'eau à travers les stomates.

L'étude de la diffusion de la vapeur d'eau a suscité un nombre considérable de publications parmi lesquelles nous mentionnerons celle de STEFAN (1881) à qui l'on doit la "loi des diamètres" (l'évaporation est proportionnelle aux diamètres des pores plutôt qu'à leur surface), puis les travaux classiques de BLACKMAN (1895), BROWN et ESCOMBE (1900), JEFFREYS (1918), SIERP et SEYBOLD (1924), VERDUIN (1949), PENMAN et SCHOFIELD (1951), BANGE (1953), KUIPER (1961), TING et LOOMIS (1963 et 1965), LEE et GATES (1964), DE PARCEVAUX (1965), HOLMGREN, JARVIS P. et JARVIS S.M. (1965). D'autres auteurs ont examiné les relations entre l'intensité photosynthétique et la résistance des stomates à la diffusion : VERDUIN et LOOMIS (1944), GAASTRA (1959).

31-2. Interdiffusion de deux gaz à travers une membrane poreuse inerte.

Depuis les premiers travaux de GRAHAM qui établit la loi régissant les débits gazeux de deux espèces moléculaires interdiffusant :

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}}$$

relation signifiant que le rapport des débits Q_1 et Q_2 est égal à la racine carrée du rapport inverse des densités ou des masses moléculaires, assez peu de travaux théoriques ont été réalisés. Des physiciens comme HOOGSHAGEN (1955), BEEK (1962) ont essayé de mesurer les coefficients de diffusion de gaz interdiffusant. Il ressort de ces travaux que tous les problèmes théoriques de la diffusion dans les corps poreux ne sont pas encore résolus.

31-3. Théorie des poromètres utilisant la diffusion des gaz.

Dans le cas des feuilles, deux études de PENMAN (1942) et MILTHORPE et PENMAN (1967) se rapportent à l'interdiffusion de l'hydrogène et de l'air.

Dans le cas des fruits (pomme) MARCELLIN (1958, 1960, 1966) vérifie d'une part la validité de la loi de GRAHAM et d'autre part extrait une valeur de la résistance aux gaz diffusant à travers les fruits ne dépendant que des caractéristiques morphométriques des organes.

3-2. Choix d'un mode d'expression du degré d'ouverture des stomates.

La mesure du débit d'hydrogène en excès sur celui d' air diffusant à contre-courant permet d'évaluer l'ouverture des stomates (LOUGUET, 1962).

Toutefois la mesure de la perméabilité exprimée en $cm^3 s^{-1}$ n'est pas exclusivement caractéristique de la feuille étudiée puisque le coefficient binaire de diffusion de l'hydrogène dans l'air (D en $cm^2 s^{-1}$) dépend de la température. MARCELLIN (1966) rappelle l'équation générale de la diffusion de deux espèces moléculaires dans un corps poreux en régime stationnaire.

$$(1) \qquad \Phi_A + \Phi_B = K D \ln \frac{\Phi_B C_1 - \Phi_A (1 - C_1)}{\Phi_B C_0 - \Phi_A (1 - C_0)}$$

Dans laquelle :

Φ_A et Φ_B sont les flux molaires constants des deux espèces moléculaires A et B à travers le corps poreux en moles s^{-1}.
K est un facteur constant en cm.
D le coefficient de diffusion binaire ($cm^2 s^{-1}$).
P la pression totale constante des gaz A et B dans le mélange(atm)
T la température absolue (°K)
R la constante des gaz parfaits = 82,0 cm^3. atm. $mole^{-1}$. $°K^{-1}$.
C_0 et C_1 étant les concentrations constantes à la pression P du gaz A,respectivement à l'entrée et à la sortie des pores.

La théorie et l'expérience montrent que :

$$\Phi_A \sqrt{M_A} + \Phi_B \sqrt{M_B} = 0$$

Dans laquelle M_A et M_B sont les masses moléculaires de A et B (loi de GRAHAM).

L'équation (1) conduit à la relation :

$$(2) \qquad \Phi_A + \Phi_B = \Pi \, Do \frac{P}{RT} \ln \frac{C_1 \sqrt{M_A} + (1 - C_1) \sqrt{M_B}}{C_0 \sqrt{M_A} + (1 - C_0) \sqrt{M_B}}$$

en valeurs algébriques

Dans laquelle :

Do est le coefficient binaire ($cm^2 s^{-1}$) tel que $\frac{D}{Do} = s$ facteur de diffusivité donc :

$$\Pi = \frac{K}{s}$$

Fig. 13. Comparaison entre les courbes représentatives des variations des rapports $\frac{\Pi\ T}{\Pi\ O}$ (mesuré) et $\frac{D\ T}{D\ O}$ (calculé) en fonction de la température (T°C).

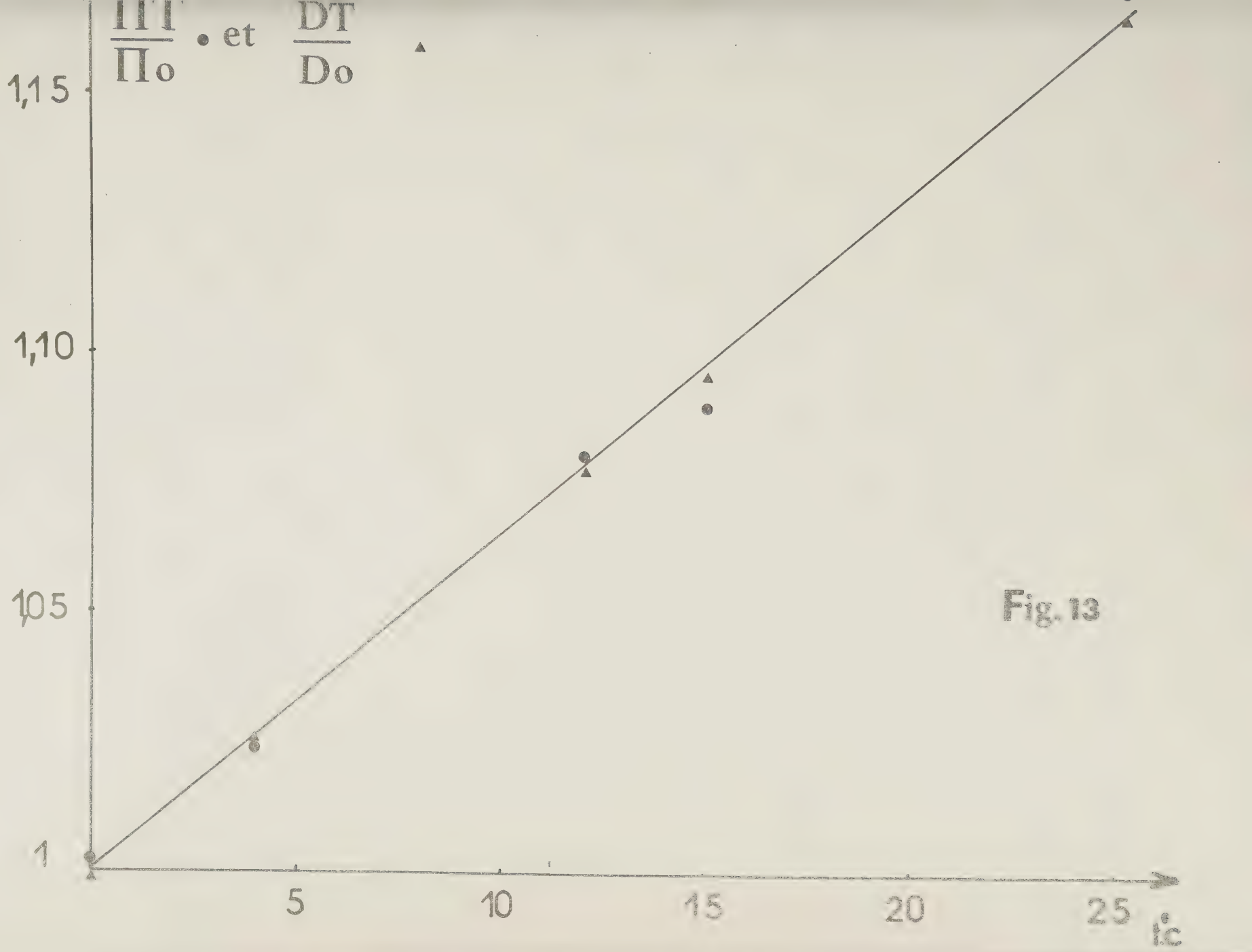


Fig. 13

Π est donc une constante exprimée en cm caractéristique de la perméabilité de l'organe poreux.

En régime pseudo-stationnaire qui est le régime pendant lequel on mesure la perméabilité dans notre méthode, on peut considérer en première approximation que $C_0 = 1$ et $C_1 = 0$, d'où la simplification.

$$(3) \quad \Phi_A + \Phi_B = \Pi \, Do \frac{P}{RT} \ln \sqrt{\frac{M_B}{M_A}}$$

Si Φ_A concerne l'air et Φ_{H_2} l'hydrogène, on a :

$$P \times Uo = (\Phi_A + \Phi_{H_2}) RT$$ (d'après la loi de Boyle-Mariotte)

Dans lequel Uo est le débit en $cm^3 s^{-1}$ mesuré tel que

$$Uo \; (cm^3 s^{-1}) = U_{H_2} - U_{air} = \Pi \, Do \ln \sqrt{\frac{29}{2}}$$

$$Uo = \Pi \, Do \ln 3,8$$

$$(4) \quad \Pi = \frac{Uo}{Do \ln 3,8} \text{ en cm}$$

Π , en régime pseudo-stationnaire, caractérise la perméabilité globale d'une portion de feuille et sera connu par la mesure de U_o déterminée directement par le déplacement de l'index dans le tube de mesure et par la valeur Do coefficient de diffusion binaire (H_2-air) donnée par les tables, qui dépend de la température. JOST (1952) donne la valeur $D_o = 0,61$ $cm^2 s^{-1}$ à la température 273°K. Ce coefficient de diffusion varie suivant une loi en bon accord avec nos propres expériences dans la gamme des températures biologiques (fig. 13).

$$\frac{DoT}{Do273} = \left(\frac{T}{273} \right)^{1,75} \quad \text{soit à } 20°C \quad D = 0,69 \; cm^2 s^{-1}$$

Π à 20°C sera égal à $\frac{Uo}{0,91}$

Fig. 14. Coupe diamétrale du dispositif permettant de mesurer la perméabilité Π de feuilles sur pied, l'hydrogène étant fourni sur la face soit supéri soit inférieure de la feuille.

Fig. 15. Courbe représentative des variations de Π de F en fonction du temps. L'hydrogène étant alternativement fourni sur la face supérieure et inférieure de F.

a.h.-CO_2 = fourniture d'air humidifié dépourvu de gaz carbonique.

DOUBLE PYROMETRE :position de balayage

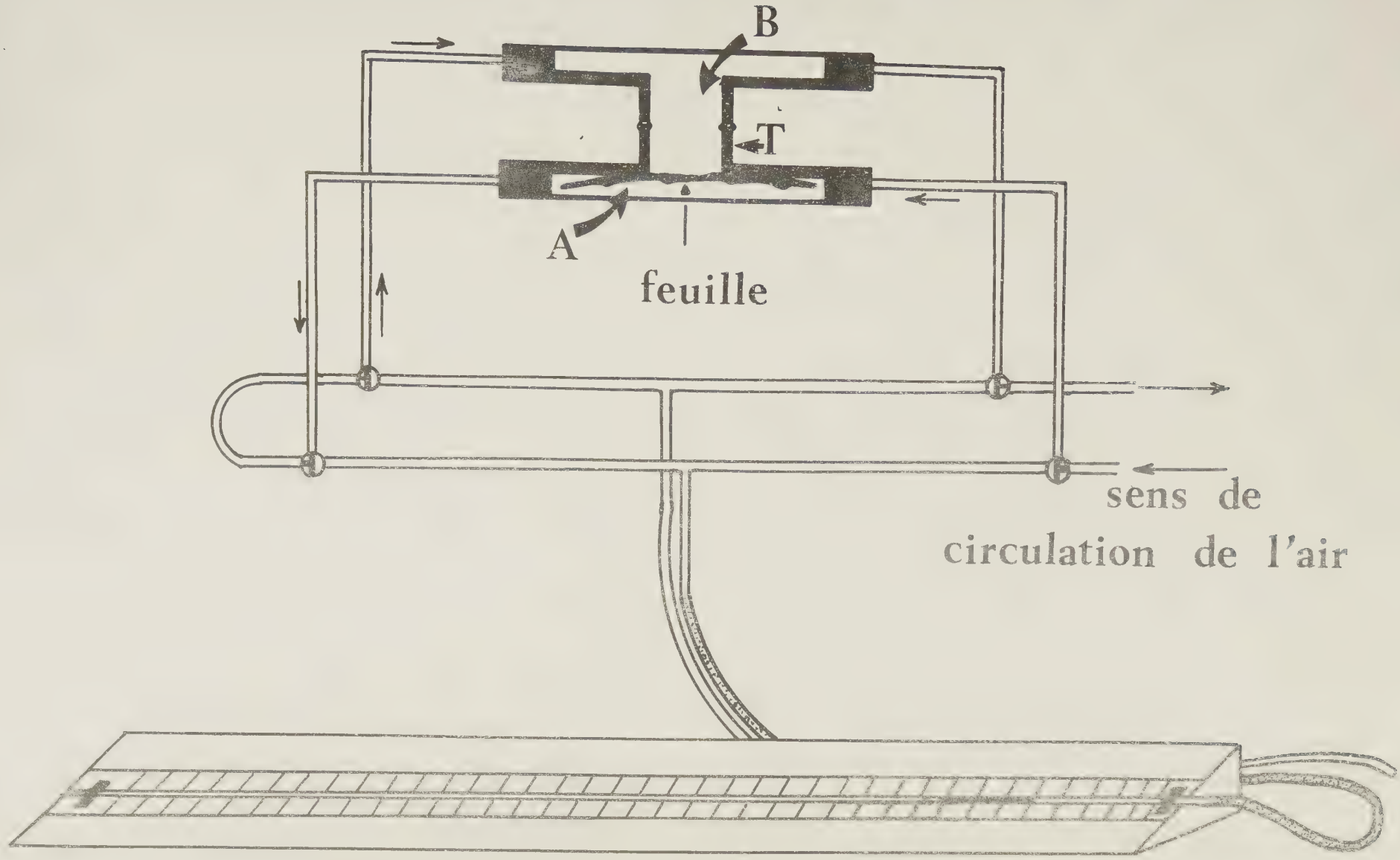


Fig. 14

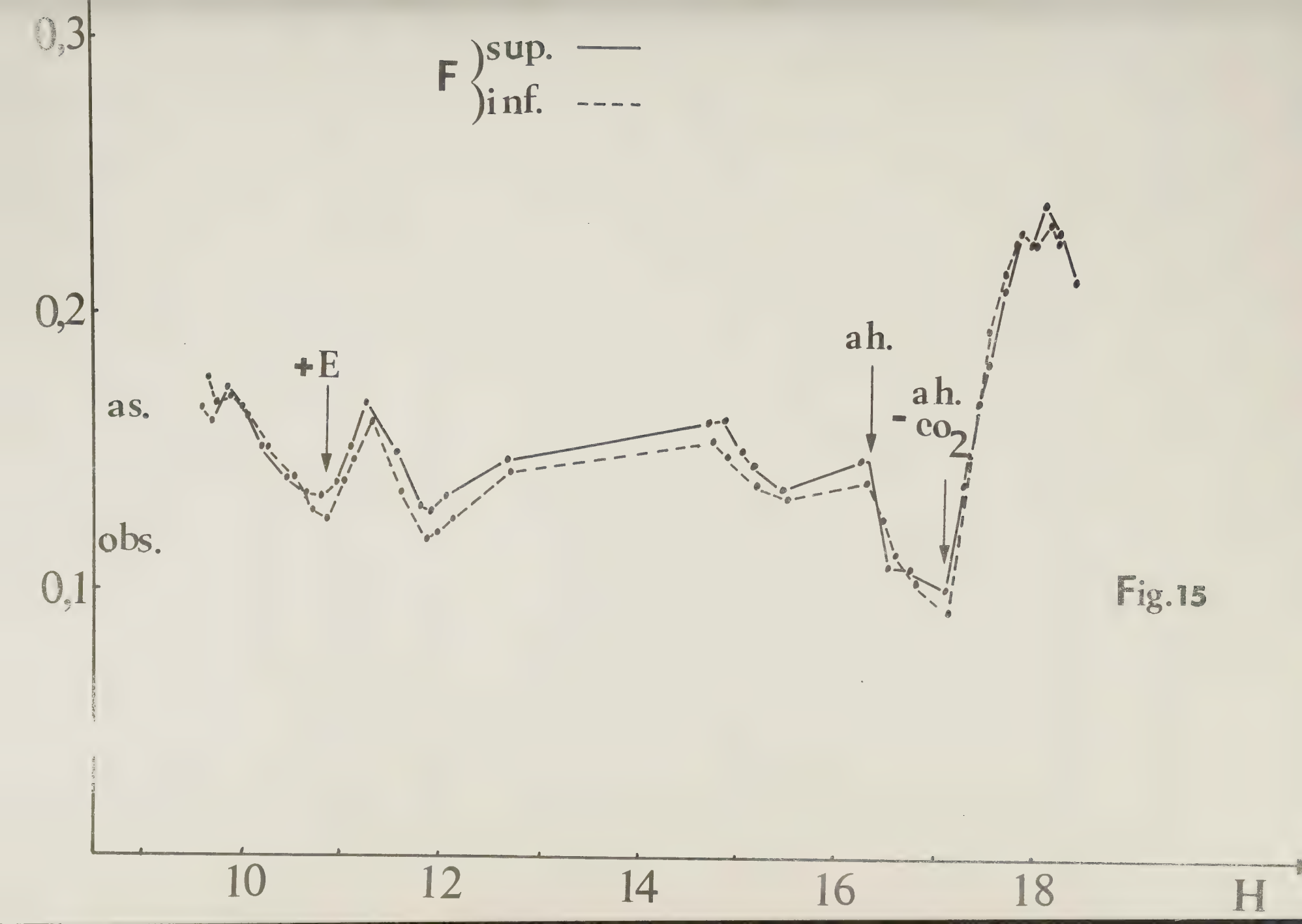


Fig. 15

La variation de Π sera choisie comme critère des variations d'ouverture des stomates.

3-3. Erreurs sur les mesures- Etude critique du mode d'expression du degré d'ouverture des stomates.

33-1. Erreurs sur les mesures.

$$\Pi = \frac{Uo}{0,91} = \frac{1}{0,91} \times \frac{1}{t} \times S \times L$$

t est le temps mesuré grâce au chronomètre pendant la mesure.
S est l'aire de section droite du tube de mesure.
L est la distance parcourue par l'index pendant le temps t.

L est choisi généralement égal à 20 cm et on mesure le déplacement de l'index dans la même portion du tube de mesure. L'erreur absolue Δt est constante 0,2 s. $\frac{\Delta\Pi}{\Pi}$ varie proportionnellement à $\frac{1}{t}$.

Lorsque Π devient supérieur à 0,45 cm, la longueur L est portée à 40 cm de sorte que l'erreur relative maximale ne dépasse pas 6% (stomates grand ouverts). En moyenne l'erreur est de 3%. Pour des stomates grand ouverts (Π = 0,9 cm), $\Delta\Pi$ = 0,054 cm ce qui suffit à expliquer les "dents de scie" observées fréquemment pour des perméabilités élevées. Le poromètre trouve ses conditions d'emploi optimales pour les moyennes et les faibles ouvertures.

33-2. Etude critique du mode d'expression du degré d'ouverture des stomates.

Quelle est la relation entre la perméabilité Π et le degré d'ouverture des stomates ? Nous allons essayer de fournir quelques éléments de réponse à partir d'une étude expérimentale et d'une discussion théorique.

332-1. Etude expérimentale.

- Première expérience.

Nous avons choisi de faire diffuser l'hydrogène de B vers A ; obtient-on une mesure identique dans le sens A vers B ? Afin d'étudier le rôle éventuel de l'inversion, nous avons monté une feuille normalement mais nous avons fixé sur le tube court T une chambre porométrique inversée, fig.14. Nous avons suivi les variations de perméabilité à l'obscurité et à la lumière en alternant l'envoi d'hydrogène à chaque mesure. La figure 15 montre un parallélisme étroit entre les deux mesures (F_1). Il semble que la mesure faite en envoyant l'hydrogène par A soit légèrement inférieure à l'autre.

Fig. 16. Comparaison des variations de Π cm et du degré d'ouverture des stomates en μ en fonction du temps lors de l'ouverture des stomates.

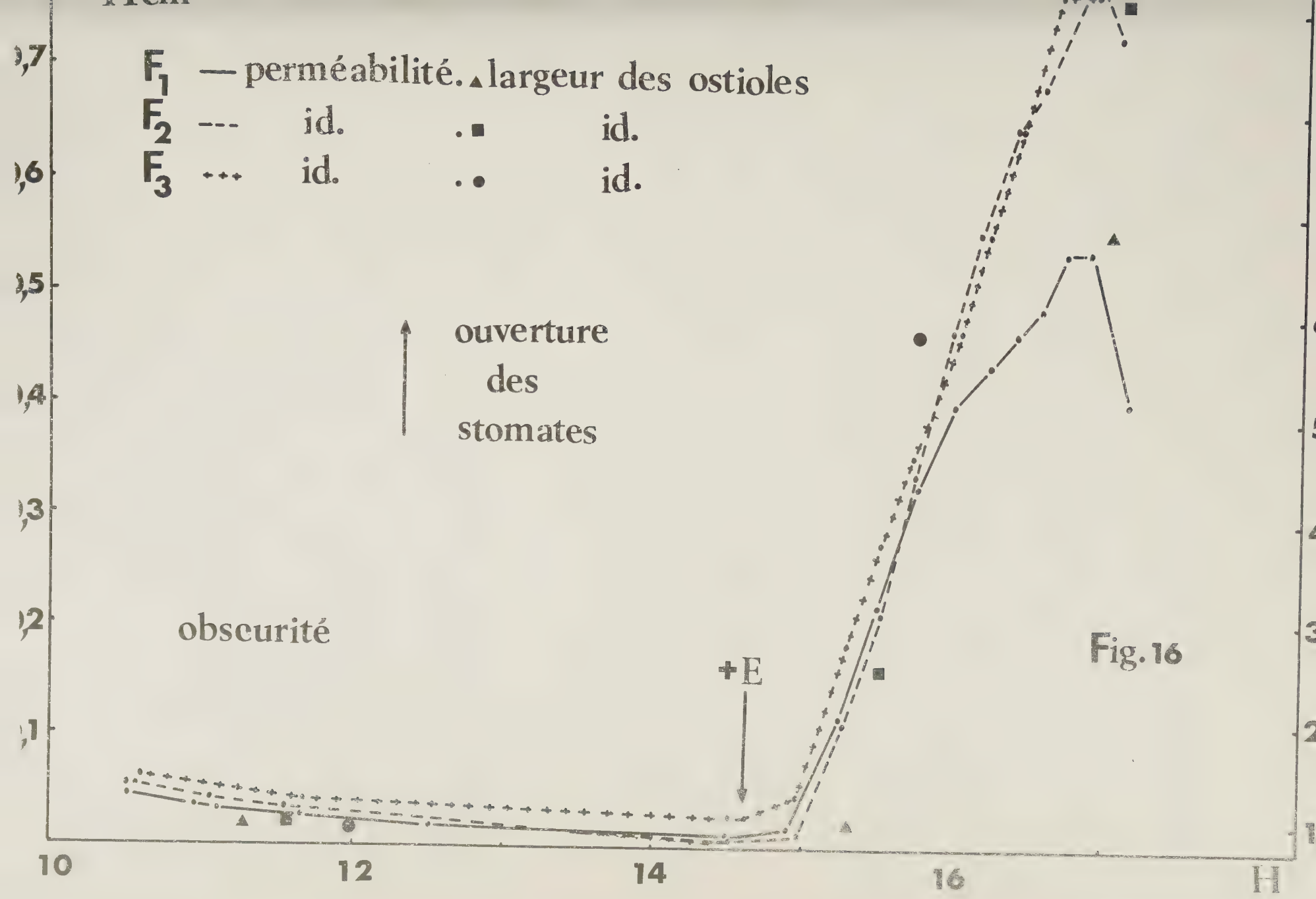

F1 — perméabilité. ▲ largeur des ostioles
F2 --- id. .■ id.
F3 ··· id. .● id.
ouverture des stomates
obscurité
+E
10
12
14
16
H

Fig. 16

Cependant l'écart est faible et les courbes se chevauchent parfois. Cette expérience montre bien que c'est la perméabilité globale de la feuille qui est mesurée.

- Deuxième expérience.

Nous avons cherché à étalonner notre méthode à l'aide d'une méthode d'observation directe, la méthode de LLOYD.

Principe.

Nous faisons ouvrir les stomates à la lumière. A des temps échelonnés et sur chaque feuille nous avons prélevé un lambeau d'épiderme inférieur que nous avons fixé dans l'alcool absolu. Nous avons apprécié la largeur de l'ouverture stomatique à l'aide d'un microscope et d'un micromètre oculaire. Entre les prélèvements nous avons suivi les variations de la perméabilité aux gaz circulant par diffusion. La vitesse d'ouverture étant constante la perméabilité qu'aurait eu la feuille au moment du prélèvement est déterminée par extrapolation.

Résultats.

Sur la figure 16 sont portées les ouvertures stomatiques et la perméabilité. Nous avons choisi les échelles de façon à faire coïncider les minimums et les maximums de perméabilité avec ceux de l'ouverture des stomates. Pour les stomates fermés nous n'avons pas obtenu d'ouverture inférieure à 1 µ ce qui signifie à notre sens que la véritable fermeture se fait au-dessous de la surface stomatique à un niveau où l'image est floue. Madame VANETTI confirme ce fait grâce au microscope électronique. Dans ces conditions, les mesures des ouvertures intermédiaires se disposent près de la courbe des variations de la perméabilité.

Discussion et critique.

Il semble donc que la perméabilité aux gaz varie proportionnellement au degré d'ouverture des stomates. Nous remarquons toutefois que les ouvertures restent faibles alors que la perméabilité augmente rapidement ; nous reviendrons sur ce point dans la discussion théorique.

Nous avons mesuré les largeurs d'ouverture de plusieurs stomates et calculé la moyenne. Une division du micromètre oculaire correspond à 1,7 µ ; dans le cas de la feuille F_1 la répartition est la suivante (pour un prélèvement) : 5,3,7,6,6,4,6,4,6,7, moyenne du nombre de divisions 5,4. Nous voyons que les écarts sont importants.

ASHBY (1931) a montré que l'écart type chez le *Pelargonium* atteint les 2/3 de la moyenne lorsque les stomates se ferment ce qui refute l'hypothèse d'une distribution normale (cette remarque peut s'interpréter de la manière suivante : au cours de la fermeture stomatique, l'intervalle des fluctuations aléatoires est alors trop grand par rapport à l'intervalle extrême de variations du degré d'ouverture des stomates (de 0 à l'ouverture maximale) pour que celui-ci puisse être assimilé à un intervalle $\{-\infty\ +\infty\}$ ce qui interdit par conséquent un ajustement à une distribution normale. Nous avons donc une assez grande incertitude sur les valeurs moyennes calculées. Aux erreurs de mesure près, nous vérifions la loi des diamètres de STEFAN pour des valeurs au moins égales ou supérieures à 2 µ qui sont d'ailleurs les valeurs rencontrées dans nos expériences ultérieures.

332-2. Critique théorique de la méthode.

3322-1. Validité de la loi de GRAHAM.

Lorsque nous avons défini Π nous avons admis la validité de la loi de GRAHAM. $\frac{\Phi H_2}{\Phi air} = \sqrt{\frac{M_{air}}{M_{H_2}}}$ quel que soit le degré d'ouverture des stomates (relation d'ailleurs adoptée par PENMAN (1942). MILTHORPE et PENMAN (1967) remettent en cause la validité de cette loi pour les canalicules étroits. En effet, dans ce dernier cas les parois interviennent pour modifier le déplacement cinétique moléculaire et le coefficient de diffusion. CARMAN (1956) donne une expression qui dépend du rayon hydraulique* moyen : le coefficient de diffusion est d'autant plus modifié que l'ouverture est plus petite. L'étude théorique menée par MILTHORPE et PENMAN sur les feuilles de blé conduit à une relation non linéaire entre l'ouverture stomatique et la perméabilité aux gaz. Toutefois un examen attentif de leur résultat montre qu'au-delà de 1 à 2 µ la courbe peut être assimilée à une droite. Nos expériences confirment ce fait; l'augmentation très rapide de la perméabilité, alors que les stomates commencent à s'ouvrir, est conforme à l'étude théorique. Comme les ouvertures stomatiques étudiées seront généralement supérieures à 1 µ nous admettrons la validité de la loi de GRAHAM comme MARCELLIN (1966) l'admet dans le cas des fruits.

3322-2. Validité de l'emploi de Π.

L'hydrogène diffusant à travers la feuille, on peut s'étonner de cette proportionnalité entre Π et le degré d'ouverture des stomates. PENMAN (1942) montre que la résistance du mésophylle dans le cas de la feuille de *Pelargonium* est négligeable dans le sens perpendiculaire à la surface foliaire. Ce n'est plus nécessairement le cas dans le sens parallèle à la surface foliaire (s'il s'agit de feuilles hypostomatiques) ou pour les feuilles d'autres espèces.

Les valeurs de la résistance aux gaz diffusant sont exprimées généralement par cm^2 de surface foliaire en $s.cm^{-1}$ parce que le coefficient de diffusion est inclus. Si nous donnons au coefficient de diffusion sa valeur on obtient $\frac{1}{\Pi}$. De toute façon la valeur absolue de Π n'est qu'indicative dans nos expériences. En effet, il est difficile de ramener Π à l'unité de surface car le joint qui limite cette surface est irrégulier. D'autre part l'expérience montre que Π varie considérablement avec les feuilles. *Les variations relatives de Π sont prises comme critère, et celles de feuilles soumises aux mêmes conditions devront être semblables.*

---

* Le rayon hydraulique est le rapport de l'aire de section droite du pore sur le périmètre.

Fig. 17. Courbe représentative de l'ouverture et de la fermeture des s
mates en fonction du temps.

1, 2, 3, 4, 5, = phases successives du mouvement des stomat

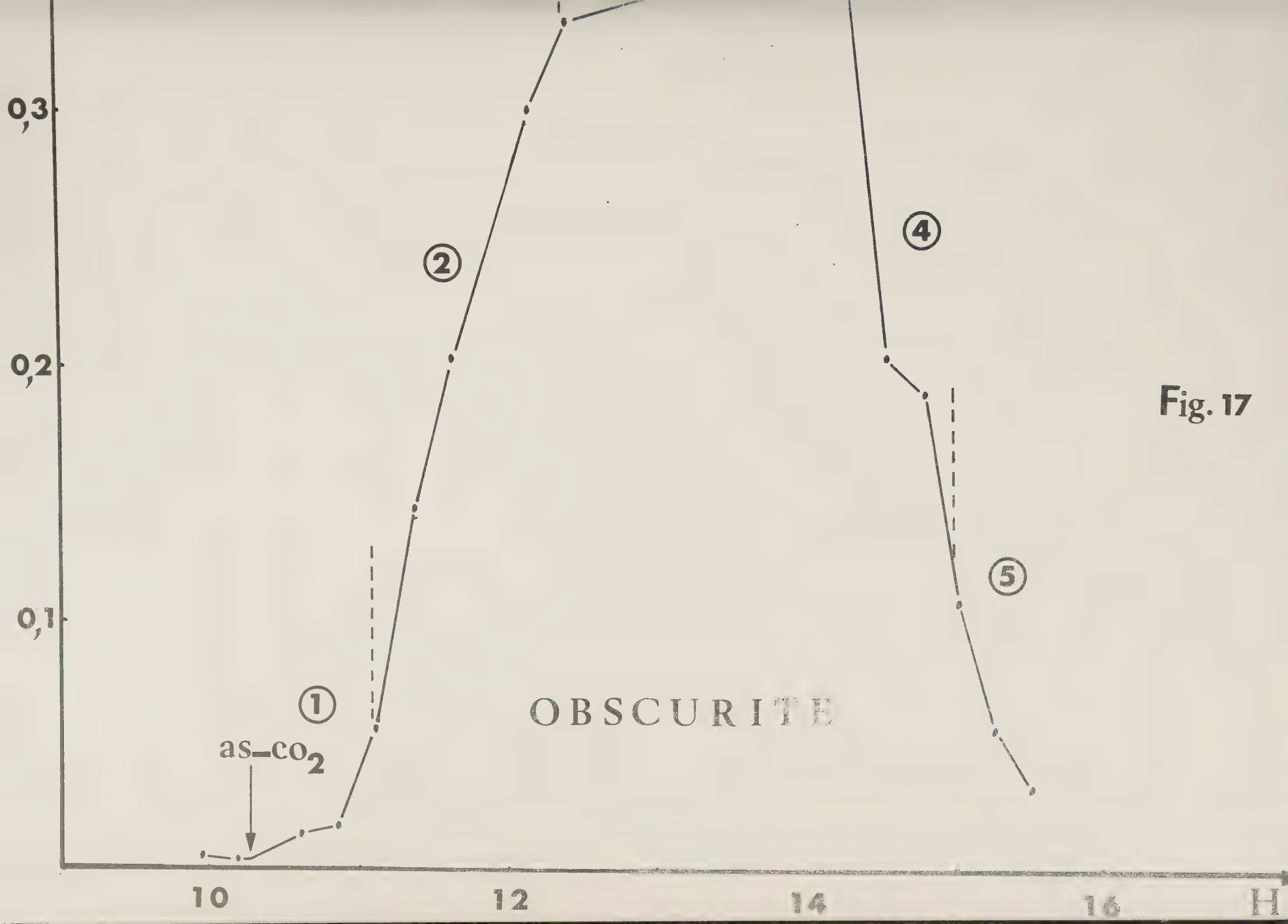


Fig. 17

3-4. Choix du mode d'expression de la vitesse du mouvement des stomates.

La mesure du degré d'ouverture des stomates et de ses variations en fonction du temps est le moyen utilisé par la plupart des auteurs dans l'étude des mouvements des stomates. Comme nous l'avons vu, ce degré peut être apprécié directement par la mesure de la largeur d'ouverture d'un certain nombre de stomates, ou bien à l'aide de méthodes indirectes parmi lesquelles les méthodes porométriques sont les plus utilisées. Toutefois, l'influence de certains facteurs externes (par exemple : la température) sur le mouvement des stomates ne peut être mise en évidence que si la vitesse du mouvement des stomates est mesurée avec une précision suffisante. Les travaux de ce genre sont assez rares. STÅLFELT (1962) adopte comme critère de vitesse l'augmentation de la largeur des cellules stomatiques appréciée par une méthode optique après une période de deux heures suivant le traitement provoquant l'ouverture. MEIDNER et HEATH (1959) à l'aide d'un poromètre utilisant les différences d'intensité de la transpiration, expriment les vitesses d'ouverture par l'inverse du temps mis pour atteindre l'ouverture maximale. Chez le *Pelargonium X hortorum* , le degré d'ouverture des stomates est apprécié à l'aide de notre méthode porométrique, ce qui nous conduit à examiner les divers critères de mesure de la vitesse des mouvements des stomates et à apprécier leurs avantages et inconvénients respectifs.

34-1. Matériel et conditions de l'expérimentation.

Les feuilles maintenues sur pied sont incluses dans la chambre porométrique et soumises à un balayage par de l'air sec débité à 40 $1h^{-1}$. La teneur en gaz carbonique et le débit gazeux de balayage sont maintenus constants à l'aide du dispositif antérieurement décrit. Les plants sont maintenus à l'obscurité pendant la durée des expériences ; la fourniture de lumière pendant la nuit, de 19h à 7h, permet le développement normal des plantes. Les expériences se déroulent dans une enceinte isotherme dont la température est maintenue constante à $\pm$ 0,5°C au niveau des feuilles. L'ouverture des stomates est provoquée *à l'obscurité* par le changement de la teneur en gaz carbonique de l'air de balayage, de 0,03% à une teneur nulle, la fermeture, par l'opération inverse. *C'est ce que nous appellerons traitement d'ouverture ou de fermeture.*

34-2. Détermination du mode d'expression de la vitesse du mouvement des stomates.

Cette vitesse peut s'exprimer de plusieurs manières ainsi qu'il ressort de l'examen de la figure 17.

342-1. Description d'une courbe représentative de l'ouverture et de la fermeture des stomates en fonction du temps.

Lorsqu'on applique à l'obscurité le traitement d'ouverture, on peut distinguer plusieurs étapes. Après un temps de latence bref (1/4 d'heure) les stomates commencent par s'ouvrir d'abord lentement, puis la vitesse croît (phase 1 sur la figure) jusqu'à atteindre une valeur constante(2)

puis elle diminue (3) pour finalement s'annuler lorsque le maximum d'ouverture est obtenu. La courbe présente une allure sigmoïde. Le traitement de fermeture est alors appliqué ; sans temps de latence, les stomates se ferment, la vitesse reste constante pendant un certain temps (4), puis diminue jusqu'au moment où est atteint le minimum d'ouverture (valeurs de Π très faibles et parfois nulles).

342-2. Etude comparée de quelques critères de mesure de la vitesse des mouvements stomatiques.

Nous avons choisi et comparé un certain nombre de critères.

3422-1. La vitesse maximale.

Nous constatons (fig. 17) que la pente de la courbe représentative de la vitesse passe par un maximum au cours de l'ouverture. Ce critère paraît satisfaisant *a priori* . Toutefois, il serait pleinement satisfaisant si la courbe était enregistrée d'une manière réellement continue. En réalité elle est obtenue à partir de mesure de Π discontinues et la vitesse maximale est donnée par le plus grand accroissement de Π entre deux mesures consécutives. Rien ne prouve que cette valeur soit bien la plus grande.Par ailleurs, les expériences montrent que la vitesse maximale observée pendant un temps court (15 mn) ne reflète pas toujours l'allure générale de la courbe pendant des temps plus longs. Enfin,l'écart entre les valeurs réelles des vitesses maximales et les mesures effectuées risque d'être d'autant plus important que ces vitesses sont plus élevées. En effet, les mesures sont réalisées tous les quarts d'heure, donc les erreurs sur la variation de Π augmentent et elles ne peuvent pas être compensées par l'augmentation du temps séparant deux mesures consécutives.

3422-2. L'accroissement ou la diminution de Π une demi heure ou une heure après le début du traitement.

On remarque que la majeure partie de la courbe dans les régions 2 et 4 est approximativement linéaire. Il est donc possible de définir une vitesse moyenne d'ouverture ; toutefois, cette façon de procéder convient surtout aux vitesses relativement grandes. Il est apparu souvent plus commode de déterminer les variations de Π après une heure de traitement ou dans le cas de vitesse élevées après une demi-heure.

- L'ouverture :

Généralement l'accroissement de Π au bout d'une heure sera retenu ; cependant, lorsque le temps de latence précédant l'ouverture est trop long, la vitesse moyenne est mieux représentée par l'accroissement de Π dans la seconde demi-heure suivant le traitement.

- La fermeture :

Là encore, pour les vitesses faibles, la diminution de Π après une heure de traitement sera genéralement utilisée. Par contre, lorsque la vitesse est plus grande, la première demi-heure suivant le changement des conditions expérimentales sera retenue. Ce choix se justifie en outre

par l'absence du temps de latence qui précède généralement l'ouverture. Il peut arriver que les temps retenus pour l'ouverture et la fermeture à propos d'une même feuille à une température déterminée soient différents (par exemple : l'ouverture peut être mesurée de manière plus précise après une heure de traitement et la fermeture après une demi-heure). Afin de comparer les vitesses, on ramène évidemment les mesures à la même unité de temps (heure).

3422-3. Le temps nécessaire pour que les stomates atteignent leur degré d'ouverture ou de fermeture maximal.

Ce critère paraît plus simple. Toutefois, *a priori*, son choix soulève un certain nombre d'objections.

- Le degré d'ouverture maximal.

Celui-ci n'est atteint qu'apres des temps prohibitivement longs, notamment aux basses températures. D'autre part, l'allure de la courbe (fig.17) montre bien que pendant la dernière phase de l'ouverture la vitesse diminue considérablement. Enfin, et toujours à cause de la nécessaire discontinuité des mesures, il est difficile de déterminer la position du maximum réel, ce qui entraîne une erreur sur la mesure du temps.

- Le degré de fermeture maximal.

Les objections développées plus haut sont encore plus justifiées ici. Le minimum d'ouverture est encore plus long à obtenir, et pour certaines températures il n'est pas obtenu dans les conditions expérimentales normales.

34-3. Résultats et discussion.

A la suite d'une étude comparative portant sur un nombre suffisant d'expériences, nous avons finalement opté pour le critère n°2, c'est-à-dire l'accroissement ou la diminution de Π une demi-heure ou une heure après le début du traitement, car il permet d'exprimer les vitesses du mouvement des stomates avec la plus grande homogénéité. Toutefois, il ne faut pas oublier que ce choix est lié, d'une part à la nature de la méthode de mesure et, d'autre part au matériel végétal. Ce problème doit être résolu avant toute étude de cinétique stomatique sur un végétal donné à l'aide d'une méthode déterminée.

L'emploi d'une méthode utilisant la diffusion libre des gaz à travers la feuille permet de mesurer avec beaucoup de finesse et de précision les vitesses des mouvements des stomates même pour les faibles ouvertures. L'importance du choix d'un critère adéquat de mesure de la vitesse apparaît encore plus clairement, lorsqu'on étudie l'effet de la température sur les vitesses du mouvement des stomates, ce que nous ferons ultérieurement.

Les techniques d'obtention de mélanges azote-oxygène seront décrites ultérieurement par souci d'homogénéité (chapitre III, paragraphe 1-2).

4- LE MATERIEL VEGETAL : CHOIX, CONDITIONS DE CULTURE ET PROBLEMES PHYSIOLOGIQUES DE L'UTILISATION DE LA METHODE.

4-1. Choix du matériel végétal.

Le choix du matériel végétal doit répondre à un certain nombre d'impératifs pratiques et théoriques.

41-1. Impératifs pratiques.

Le matériel végétal doit être disponible à moindres frais tout le long de l'année. Les feuilles doivent être de dimensions suffisantes, ce qui permet d'obtenir un débit suffisamment élevé et facilite les manipulations. La plante doit pouvoir se développer en conditions artificielles.

41-2. Impératifs théoriques.

La feuille étudiée doit être amphistomatique. La plante doit être peu sensible aux conditions hygrométriques car notre problème principal concerne le mécanisme physiologique des stomates en relation avec la teneur en gaz carbonique de l'air. La structure des espaces intercellulaires doit être suffisamment lâche de façon à n'apporter dans le sens transversal qu'une résistance aux gaz négligeable vis-à-vis de la résistance rencontrée au niveau des stomates. Le Géranium commun (*Pelargonium X hortorum)* remplit ces conditions.

4-2.Conditions de culture.

Nous disposons d'une variété à fleurs rouges simples propagée par bouturage au laboratoire depuis 1958. Les boutures se développent d'abord dans la serre. Lorsque les plantes ont atteint le stade 10 à 20 feuilles elles sont portées en conditions artificielles. Les plantes abondamment arrosées sont éclairées par une batterie de douze tubes luminescents PHILLIPS (lumière du jour de luxe et blanc super) fournissant un éclairemement moyen à mi-hauteur de l'ordre de 4000 lux. Les expériences étant réalisées à l'obscurité, nous avons fourni la lumière indispensable 12 heures par jour de 19h à 7h. Le *Pelargonium X hortorum* n'a pas d'exigence photopériodique et fleurit normalement dans ces conditions. Lorsqu'un certain nombre de feuilles ont été expérimentées la levée d'inhibition des bourgeons axillaires entraîne l'apparition de nombreuses feuilles petites et la plante est remplacée. L'hygrométrie de l'air est généralement basse (30 à 40%) ; la température peut varier de 20° à 25°C, pour les plantes cultivées en dehors de la chambre isotherme.

4-3. Les problèmes physiologiques posés par l'utilisation de la méthode.

Ces problèmes se posent particulièrement pour les méthodes poro-

métriques car on mesure les variations d'ouverture des mêmes stomates. La méthode ne doit donc avoir aucune influence sur le mouvement des stomates. On utilise l'hydrogène. Ce gaz présente l'avantage d'être peu soluble dans l'eau donc dans les cellules. On ne lui connaît pas d'action particulière sur le métabolisme cellulaire des plantes supérieures. C'est ainsi que les auteurs ont pu créer une anaérobiose en atmosphère soit d'azote soit d'hydrogène. Il paraît plus probable que les risques éventuels d'action sont en rapport avec la modification des conditions extérieures au moment de la mesure. Le problème sera examiné du point de vue théorique et pratique.

43-1. Examen théorique du problème.

Une première observation de GREGORY et ARMSTRONG (1937) indique que l'hydrogène empêche la fermeture nocturne des stomates, lorsque les feuilles sont soumises à un balayage continu d'hydrogène pur. Nous avons pu montrer que l'inhibition est due aux conditions anaérobies. Pendant une mesure la feuille est-elle soumise à l'anaérobiose ? Si la loi de GRAHAM est vérifiée le débit d'air diffusant à contre-courant est environ 2,8 fois plus faible que celui d'hydrogène ce qui correspond théoriquement à un abaissement de la pression partielle d'oxygène jusqu'à 7% ; ce ne sont donc pas des conditions d'anaérobiose totale. D'autre part l'hydrogène diffuse pendant 30s à 60s maximum. Enfin, la méthode ne crée pas de variations de pression totale dans la feuille contrairement à celle utilisant le "poromètre à résistance" ; une surpression peut en effet être responsable de variations de résistance au sein du parenchyme (MEIDNER, 1955) ou même provoquer la fermeture de stomates très peu ouverts (PENMAN et MILTHORPE, 1967).

43-2. Examen pratique du problème.

Dans l'absolu, il est évidemment impossible de savoir quel serait le mouvement des stomates en l'absence d'application de la méthode. Tout d'abord, nous pensons que si l'hydrogène a une action, celle-ci doit se manifester toujours de la même façon et d'autant plus que les mesures seront plus rapprochées. Pour examiner ce problème nous avons fait ouvrir des stomates. Nous avons vu qu'à 20°C la courbe représentative de l'ouverture stomatique en fonction du temps est linéaire pendant 1h30 à 2h. Pendant la phase linéaire, nous faisons des mesures tous les quarts d'heure ; au début, les points se disposent sur une droite. Si,à ce moment on fournit l'hydrogène plus souvent en accélérant le rythme des mesures par exemple une mesure toutes les cinq minutes, ou bien l'hydrogène a un effet sur l'ouverture, et la courbe représentative s'écartera de la droite ou il n'a aucun effet et les points se répartiront toujours sur la même droite, c'est ce que nous observons effectivement. Dans nos expériences, il n'est jamais nécessaire de faire deux mesures consécutives à des intervalles de temps inférieurs à cinq minutes. Enfin la fidélité des mesures est bonne car si après une mesure on chasse l'hydrogène de la chambre par un balayage d'air pendant trente secondes, et on refait une nouvelle mesure, on obtient le même résultat aux erreurs de chronométrage près.

Enfin, un dernier argument repose sur les résultats bien établis décrits dans la littérature, que nous avons vérifiés et même parfois pré-

cisés grâce à notre méthode.

Conclusion.

Les qualités essentielles de la méthode sont la simplicité et la précision. Cette finesse permet d'aborder les problèmes de la cinétique d'ouverture et de fermeture des stomates. Elle est particulièrement intéressante dans l'étude de stomates peu ouverts. Elle ne peut pas être utilisée sur n'importe quel matériel végétal. Les feuilles amphistomatiques conviennent particulièrement, celles du *Pelargonium* par exemple, mais également celles de Monocotylédones telles que le Blé ou le Maïs. Si son utilisation dans les problèmes écophysiologiques n'est pas à exclure, nous pensons qu'il s'agit surtout d'une méthode de laboratoire fine qui va nous permettre d'aborder maintenant les expériences relatives aux recherches sur les mécanismes du mouvement des stomates.

- C H A P I T R E II -

I N F L U E N C E D E L A T E N E U R E N G A Z C A R B O N I- Q U E D E L ' A I R S U R L E M O U V E M E N T D ' O U V E R T U- R E E T D E F E R M E T U R E D E S S T O M A T E S : M O D I F I- C A T I O N S S O U S L ' E F F E T D E L A L U M I E R E , D E L A T E N E U R E N V A P E U R D ' E A U D E L ' A T M O S P H E R E E T D E L A T E M P E R A T U R E.

INTRODUCTION.

L'étude des effets des variations de la teneur en gaz carbonique de l'air sur le mouvement des stomates a été réalisé par de nombreux auteurs. On trouvera une bibliographie abondante dans les mises au point de STÅLFELT (1956), HEATH (1959), KETTELAPPER (1963), ZELITCH (1963-1970) ainsi que dans l'ouvrage de MEIDNER et MANSFIELD (1968). Ces auteurs ont mis en évidence le rôle du gaz carbonique en l'absence et en présence de lumière. La conclusion générale que l'on peut dégager de ces différents travaux est que la *teneur en gaz carbonique de l'air est l'un des facteurs externes les plus importants qui interviennent dans le contrôle du mouvement des stomates.* Dans une série d'expériences particulièrement probantes, HEATH et RUSSEL (1954-a-b) ont précisé les interactions entre la teneur en gaz carbonique de l'air et l'intensité de l'éclairement. Cependant, si les faits sont indiscutables, par contre l'interprétation du rôle du gaz carbonique est actuellement controversée. Selon MEIDNER et MANSFIELD (1968) l'ouverture des stomates observée à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique procèderait, pour une part importante au moins, du même mécanisme que l'ouverture en présence de lumière et d'une teneur en gaz carbonique de l'air "normale" soit 0,03% en volume. La lumière provoquerait l'ouverture des stomates de manière indirecte par la réduction du taux de gaz carbonique au niveau des cellules stomatiques causée par la photosynthèse. Toutefois d'au-

teurs, KUIPER (1964), MOURAVIEFF (1958-1963) ainsi que MEIDNER et MANSFIELD eux-mêmes montrent que l'efficacité des radiations bleues (439nm) à énergie égale est beaucoup plus élevée que celle des radiations rouges (660 nm).

MEIDNER et MANSFIELD estiment que cette propriété est difficilement expliquée par l'hypothèse de la consommation photosynthétique accrue du gaz carbonique en présence de radiations bleues ; en conséquence, l'hypothèse d'un mécanisme direct d'action de la lumière a été envisagé par ces auteurs. Il faut toutefois signaler que MOURAVIEFF (1963) a obtenu une ouverture en lumière verte mais cet auteur a montré que la photosynthèse est alors loin d'être négligeable et que, au contraire, elle permettait d'abaisser la teneur en gaz carbonique suffisamment pour expliquer l'ouverture en accord avec la première hypothèse. ZELITCH (1969), au contraire, estime que le mouvement des stomates observé à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique procède d'un mécanisme différent de l'ouverture à la lumière. L'auteur tire argument entre autres d'une série d'expériences que nous avons publiées (LOUGUET, 1965) et que nous discuterons par la suite. Il apparaît donc que malgré de nombreux travaux sur ce problème, l'unanimité ne s'est pas faite. Il nous paraît indispensable de présenter nos propres expériences et de donner nos conclusions sur cet aspect fondamental de la physiologie des stomates. Cette étude est également nécessaire car, outre la complexité des mécanismes envisagés pour tenter d'expliquer le mouvement des stomates, s'ajoute une variabilité des réponses liée au matériel végétal qui peut expliquer certains résultats apparemment contradictoires signalés dans la littérature.

Aucun examen systématique du mouvement des stomates à l'obscurité en fonction des variations de la teneur en gaz carbonique de l'air n'a été entrepris jusqu'ici. Or cette étude présente un important avantage sur les expériences en présence de lumière. En effet les interprétations sont rendues délicates à cause des interactions lumière- gaz carbonique et le mécanisme photosynthétique interfère avec le mouvement des stomates. Ces interférences sont à l'origine d'hypothèses très controversées, citons particulièrement celle du rôle de l'acide glycolique (ZELITCH, 1969) déjà mentionnée page 2 . Cette étude va nous permettre également de connaître les particularités de notre matériel le *Pelargonium X hortorum*, et d'orienter ainsi les expériences ultérieures.

1- OUVERTURE ET FERMETURE STOMATIQUES PROVOQUEES PAR LES VARIATIONS DE LA TENEUR EN GAZ CARBONIQUE A L'OBSCURITE.

1-1. Effets de la suppression du gaz carbonique de l'air et du retour dans l'air (teneur en CO_2 0,03%).

11-1. Conditions expérimentales.

Avant l'expérience proprement dite, les feuilles sont soumises à nos conditions standardisées. La lumière est fournie de 19h à 7h pendant la nuit. Les chambres porométriques sont balayées par de l'air sec débité à 40 $1.h^{-1}$. La teneur en gaz carbonique de l'air est maintenue constante à 0,03% en volume grâce au dispositif déjà décrit. La température est maintenue

Fig. 18. Courbes représentatives des variations du degré d'ouverture des stomates en fonction du temps provoquées par la fourniture d'air sec dépourvu de gaz carbonique (as - CO_2) puis le retour en air normal (as + CO_2 3.10^{-4}).

Fig. 19. Expérience comparable à celle de la figure 18 avec en plus l'observation de la réouverture dans l'après-midi lors de la fourniture d'air dépourvu de gaz carbonique.

Fig. 18

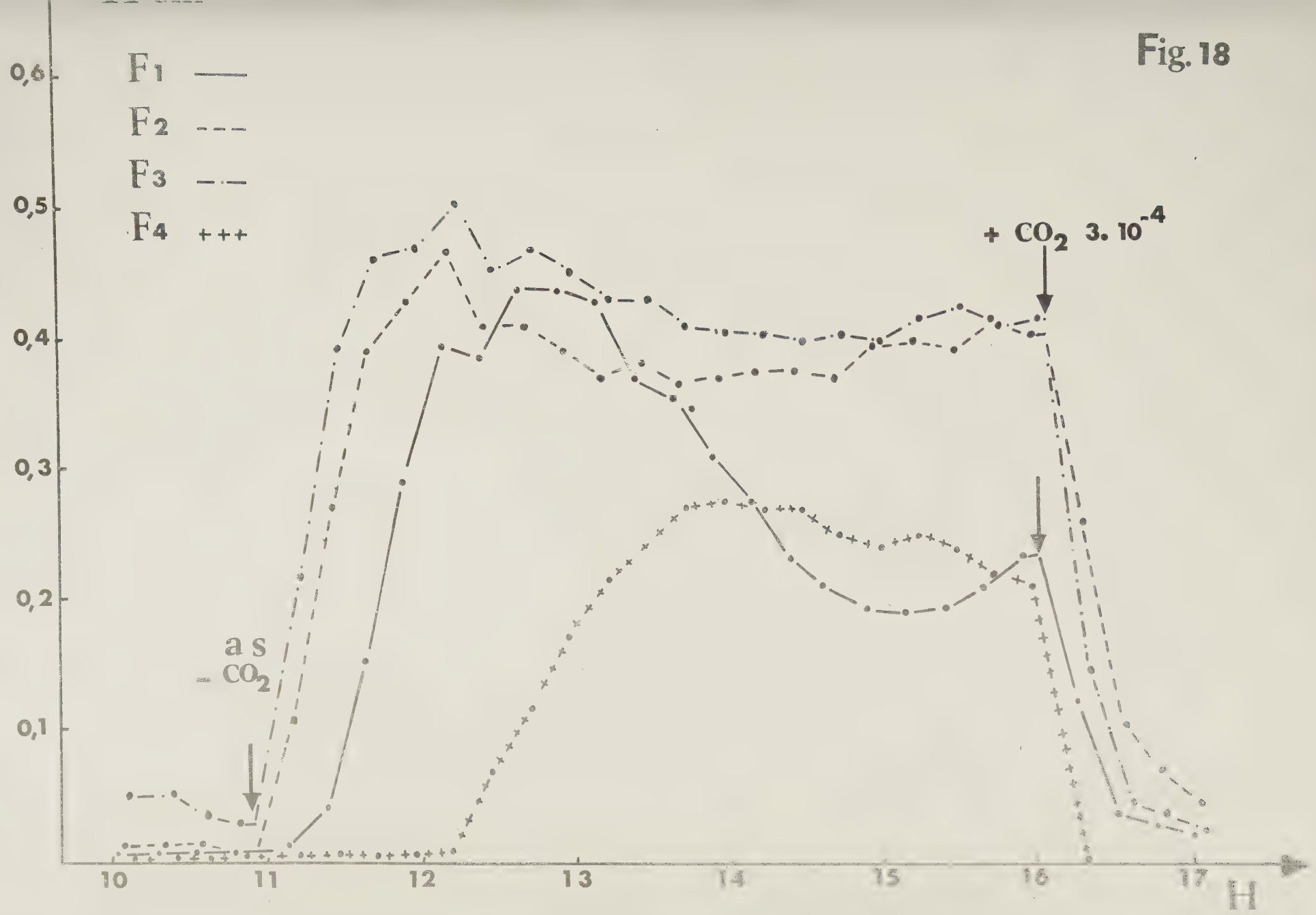
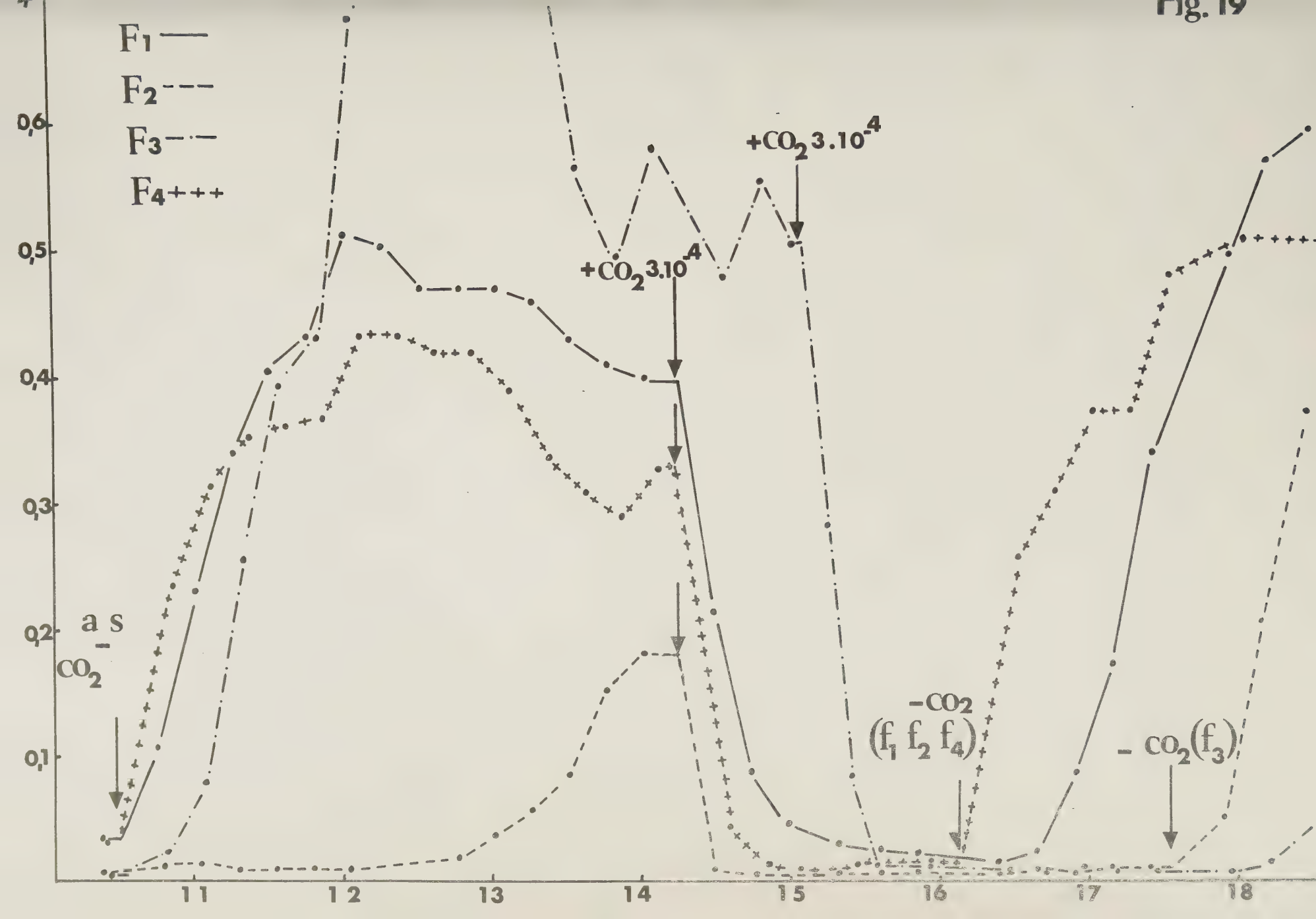


Fig. 19


F1
F2
F3
F4
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
+CO2 3.10-4
+CO2 3.10-4
a s
CO2
-CO2
(f1 f2 f4)
- CO2(f3)
11
12
13
14
15
16
17
18

constante à 20°C ± 0,5°C. L'expérience consiste à supprimer le gaz carbonique de l'air en l'absorbant par de l'ascarite. L'analyseur de gaz carbonique placé à la sortie du circuit de balayage permet de contrôler à tout moment la teneur en gaz carbonique.

II-2. Résultats.

II2-1. Première expérience.

La figure 18 montre les différentes possibilités que l'on peut observer. Lorsqu'on supprime le gaz carbonique les stomates s'ouvrent sans délai pour les feuilles F_2 et F_3, avec un léger temps de latence (1/4 d'heure) pour F_1 et un temps de latence beaucoup plus long pour F_4 (1h 1/4 environ). Le degré d'ouverture passe par un maximum puis diminue de manière variable suivant les feuilles et se stabilise pendant plusieurs heures. Le retour en air normal entraîne une fermeture immédiate.

II2-2. Deuxième expérience.

Dans l'expérience décrite figure 19, le gaz carbonique est fourni d'abord aux feuilles 1, 2 et 4 dont les stomates se ferment sans délai, puis à la feuille 3 dont les stomates se ferment alors. Si on supprime le gaz carbonique de l'air à nouveau (16h 10) pour F_1, F_2 et F_4 les stomates de ces feuilles s'ouvrent à nouveau, remarquons que le temps de latence de F_2 reste important. Puis si l'on fait subir le même traitement à F_3 les stomates s'ouvrent à nouveau.

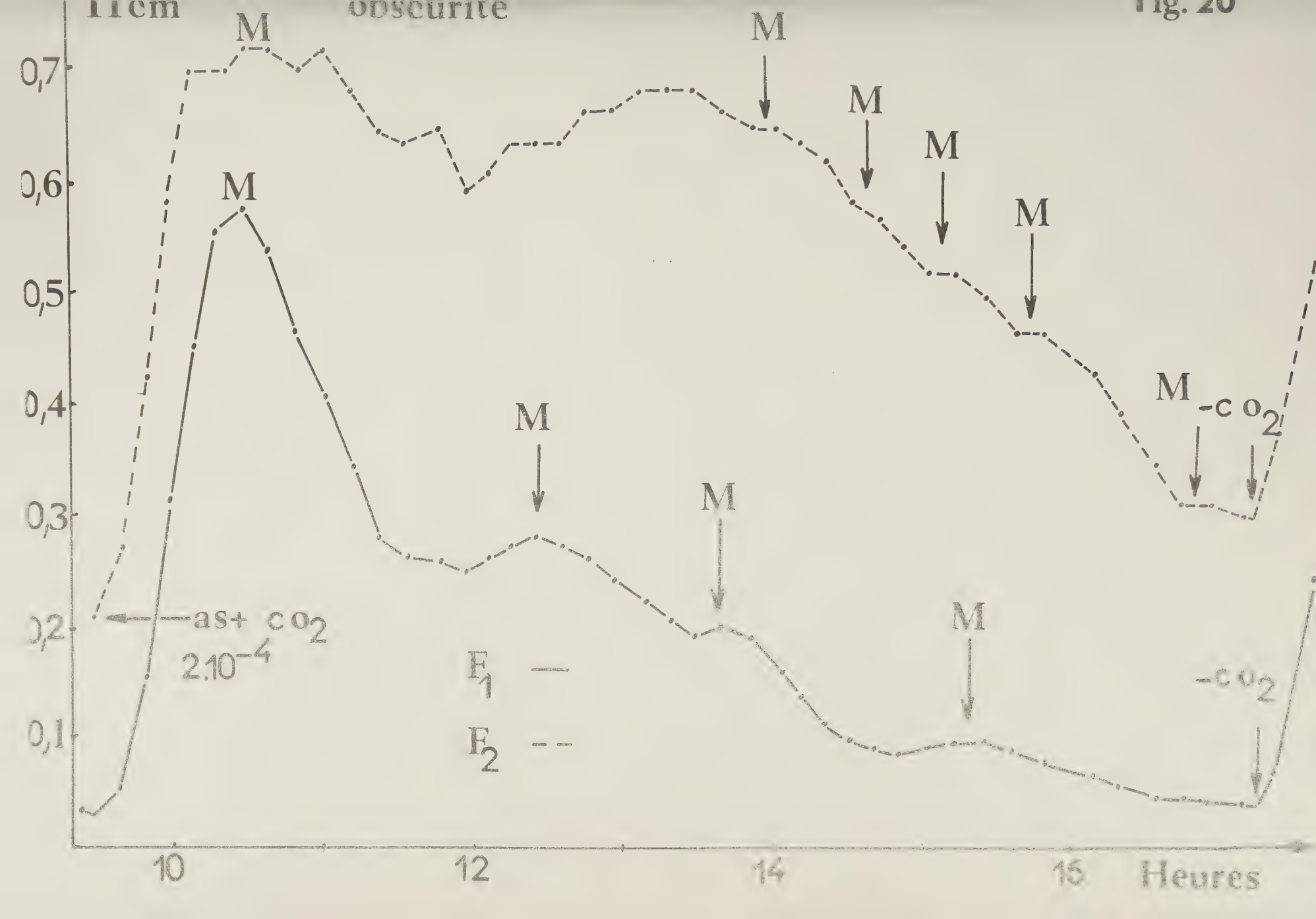
II-3. Discussion et interprétation.

II3-1. Première expérience.

Nous constatons que l'air dépourvu de gaz carbonique entraîne une ouverture importante des stomates et que cette *ouverture se maintient généralement plusieurs heures*. Le degré d'ouverture obtenu à l'équilibre est toujours inférieur au maximum obtenu lors de la phase transitoire d'ouverture. La figure 18 schématise les diverses modalités observées chez le *Pelargonium X hortorum* et permet de souligner déjà l'une des difficultés principales rencontrées au cours de nos expériences à savoir la variabilité des réponses observées. Les temps de latence brefs (1/4 à 1/2 heure) sont observés dans la moitié des cas environ. De manière générale le temps de latence n'existe pas lorsque les stomates sont légèrement ouverts (Π 0,02 à 0,04) à l'obscurité en présence de gaz carbonique (cas de F_3). Il résulte de l'observation précédente que l'on peut formuler une hypothèse expliquant ce temps de latence. Lorsque les stomates sont fermés les échanges gazeux s'effectuant par diffusion sont considérablement ralentis à cause de l'importante résistance à la diffusion libre des gaz au niveau des ostioles. Dans ces conditions, le temps de latence représenterait le temps nécessaire pour que la teneur en gaz carbonique dans les espaces intercellulaires s'équilibre avec la teneur nulle de l'air de balayage. Cette hypothèse en implique d'ailleurs une seconde:

Fig. 20. Mouvements rythmiques des stomates à l'obscurité, toutes conditions expérimentales maintenues constantes.

M = Maximum.


11cm
obscurite
Fig. 20
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
M
as+ co_2
2.10^{-4}
F_1
F_2
-co_2
M -co_2
10
12
14
16
Heures

le gaz carbonique libre ou combiné des cellules stomatiques diffuserait avec une intensité plus forte dans la chambre sous-stomatique ou vers les cellules compagnes que directement vers l'extérieur. L'étude anatomique de l'appareil stomatique ne révèle pas de contradiction avec ces hypothèses.

Toutefois elles ne peuvent constituer les seules hypothèses car si F_1 satisfait aux conditions discutées plus haut, nous constatons que F_2 dont les stomates sont aussi fermés que ceux de F_1 ne présente pas de temps de latence.

Un temps de latence aussi long que celui observé chez F_4 est beaucoup plus rare, et nous ne pouvons pas en fournir d'explication satisfaisante. Nous pouvons donner seulement un complément d'information. Lorsque cette feuille est devenue inutilisable, nous avons mis en expérience une seconde feuille issue du même plant. Celle-ci a présenté également ce temps de latence long ce qui conduit à penser que cette propriété n'est pas spécifique à la feuille mais à la plante. En présence de lumière nous ne pouvons pas mettre en évidence de temps de latence ; si celui-ci existe il doit être très court. Cette observation est en faveur de l'hypothèse mentionnée précédemment sur le retard à l'établissement d'un équilibre entre la teneur en gaz carbonique extérieure et dans la feuille. La lumière entraîne directement une diminution de la teneur en gaz carbonique dans les cellules chlorophylliennes et dans les méats (MEIDNER et MANSFIELD, 1968) au moins jusqu'au point de compensation, ce qui peut entraîner une ouverture plus rapide. *La fermeture provoquée par la fourniture de gaz carbonique se fait sans délai à l'obscurité.*

113-2. Deuxième expérience.

L'expérience décrite figure 19 confirme que les feuilles réagissent individuellement aux variations de la teneur en gaz carbonique. On constate qu'en l'absence de gaz carbonique il y a réouverture donc on ne décèle pas une hypothétique "tendance à la fermeture " spontanée en fin de journée signalée par de nombreux auteurs dont HEATH (1959).

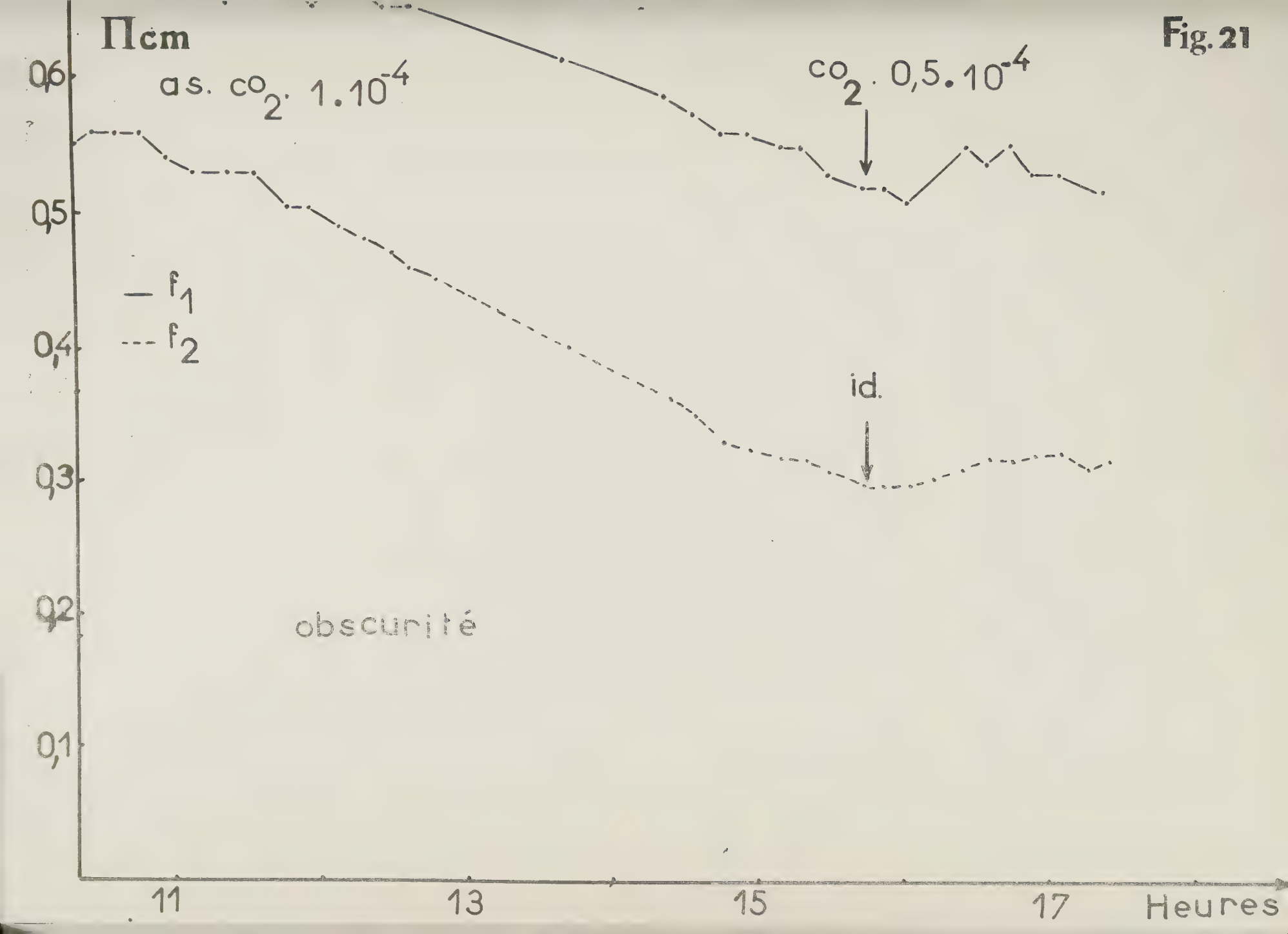
1-2. Effets des faibles concentrations en gaz carbonique.

Nous venons d'examiner l'influence de la suppression du gaz carbonique de l'air. Nous allons rechercher en premier lieu les effets des teneurs en gaz carbonique constantes comprises entre 0,01 et 0,03% puis nous ferons varier légèrement cette concentration.

12-1. Première expérience : effets d'une teneur en gaz carbonique constante de 0,02%.

La courbe descriptive des variations de l'ouverture stomatique est représentée fig. 20. Lorsque de l'air à 0,02% de gaz carbonique est substitué à l'air normal, on observe une ouverture des stomates jusqu'à

Fig. 21. Influence de faibles variations de la teneur en gaz carbonique de l'air de balayage des feuilles sur le mouvement des stomates à l'obscurité.


Пcm
Fig. 21
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
as. CO_2. 1.10^{-4}
CO_2. $0,5.10^{-4}$
— f_1
--- f_2
id.
obscurité
11
13
15
17
Heures

l'obtention d'un maximum M après une heure trente environ (1ère phase), puis on[a]une fermeture immédiate et limitée (cas de F_1) parfois ce mouvement n'est pas observé (cas de F_2 2è phase). Toutes conditions maintenues constantes, on n'obtient jamais un degré d'ouverture stable. On observe des oscillations rythmiques : nouvelle fermeture, réouverture. Ces oscillations sont de faible amplitude et ne peuvent être mises en évidence que grâce à la finesse de la méthode de mesure utilisée.Le mouvement d'ensemble au bout de plusieurs heures traduit une tendance à la fermeture. Si l'air est débarrassé de son gaz carbonique, on observe immédiatement une ouverture.

12-2. Deuxième expérience : effet d'une modification légère de la teneur en gaz carbonique.

La deuxième phase est seule représentée dans le schéma figure 21. Si, après avoir obtenu un degré d'ouverture évoluant régulièrement en présence d'une teneur en gaz carbonique de 1.10^{-4}, on passe à $0,5.10^{-4}$ on constate que ce mouvement de fermeture s'arrête.

La sensibilité des stomates aux variations de la teneur en gaz carbonique dans nos conditions expérimentales est donc très importante.

12-3. Discussion et interprétation.

Nous observons dans cette expérience (fig. 20) comme dans les expériences déjà décrites lors de l'examen des effets des teneurs en gaz carbonique nulles que le degré d'ouverture en équilibre avec une teneur en gaz carbonique déterminée n'est pas atteint directement mais que le degré d'ouverture passe d'abord par un maximum. Nous retrouvons également la tendance lente à la fermeture. Mais cette fois il est possible d'enrayer cette tendance en diminuant légèrement la teneur en gaz carbonique (fig. 21). L'impossibilité de maintenir un degré d'ouverture rigoureusement constant à l'obscurité rend difficile,a priori, l'étude des effets d'autres facteurs externes. Heureusement, il est possible de prévoir dans une large mesure les limites de ces variations.

Tout d'abord il s'agit dans tous les cas d'une "tendance à la fermeture". D'autre part si nous considérons par exemple le degré d'ouverture de la feuille 1 fig. 20 entre 12h et 14h30 il n'a diminué que d'un micron pendant ce temps si l'on se réfère à la méthode optique, plus familière, alors qu'après la fourniture d'air dépourvu de gaz carbonique à 17h30, l'ostiole s'est agrandie de 3 µ en 20 minutes.

Les effets eventuels d'un facteur externe devront donc dépasser largement les fluctuations endogènes pour qu'ils soient considérés comme positifs. L'intérêt de l'utilisation des faibles teneurs en gaz carbonique réside essentiellement dans la possibilité d'obtenir un degré d'ouverture intermédiaire entre l'ouverture minimale et maximale, ce qui permet d'observer l'évolution du degré d'ouverture soit vers l'ouverture soit vers la fermeture ; cette possibilité est en effet exclue lorsque les stomates sont ouverts au maximum ou complètement fermés.

Le principal enseignement de l'expérience décrite fig 21 est la

nécessité de maintenir et de contrôler de manière rigoureuse la teneur en gaz carbonique de l'air de balayage des feuilles.

Du point de vue physiologique, nous avons mis en évidence des oscillations rythmiques dont les périodes varient de une à deux heures. Le problème des rythmes endogènes dans le mouvement des stomates est très important et très complexe. Il est nécessaire de faire ici rapidement le point sur ces rythmes et d'examiner leurs incidences dans nos études sur le mouvement des stomates.

MEIDNER ET MANSFIELD (1968) consacrent un chapitre de leur ouvrage aux différents rythmes observés dans le mouvement des stomates. Nous remarquons d'abord que certains rythmes semblent liés à telle ou telle plante mais n'ont pas un caractère de généralité absolue. C'est le cas notamment des ouvertures stomatiques à l'obscurité en présence d'une teneur en gaz carbonique de l'air normale. Chez le *Pelargonium X hortorum* nous avons observé qu'après une période d'obscurité prolongée il était possible d'observer une faible ouverture stomatique qui s'annule le plus souvent d'ailleurs après deux ou trois mesures. D'autre part, des ouvertures plus importantes ($\Pi \simeq 0{,}1$ cm) ont été observées également.

Dans la plupart des cas nous avons pu vérifier que cette ouverture anormale était le *premier symptôme du vieillissement foliaire* quelles qu'en soient les causes et nous avons rejeté ces feuilles pour l'expérimentation.

En ce qui concerne l'existence de rythmes portant sur des périodes de 24 heures, nos conditions expérimentales sont très particulières puisque les plantes sont éclairées pendant la nuit et à l'obscurité pendant le jour. Nous n'avons pas mis en évidence de différence de vitesse d'ouverture ou de fermeture liée à l'heure de l'expérimentation. Toutefois les expériences qui doivent être comparées sont toujours effectuées à la même heure, de manière à éviter l'effet éventuel d'un rythme circadien. C'est pourquoi sur nos courbes l'heure de la manipulation est toujours signalée. Il est important de mentionner que lorsque les plantes de *Pelargonium* sont transférés de la serre dans notre enceinte expérimentale une période d'une quinzaine de jours est nécessaire pour que les plantes s'adaptent aux nouvelles conditions : c'est-à-dire que le mouvement des stomates retrouve seulement alors les modalités que nous décrivons dans nos conditions expérimentales. Cette adaptation se traduit par une aptitude croissante des stomates à s'ouvrir largement à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique au cours de la période d'adaptation.

Par contre, il apparaît nettement (fig. 20) qu'il existe des rythmes de période relativement faible, une à deux heures environ. Le déphasage entre les périodes des deux feuilles montre que cette périodicité n'est pas liée à l'action d'un quelconque facteur externe non contrôlé. STÅLFELT (1956) estime que ces oscillations sont liées à l'apparition d'un déficit hydrique par suite d'une transpiration excessive qui entraîne une fermeture des stomates ; la transpiration diminuant, le déficit hydrique disparaît, les stomates s'ouvrent à nouveau et ainsi de suite. Cette interprétation ne nous paraît guère plausible dans le cas de *Pelargonium X hortorum* compte tenu des expériences décrites ultérieurement dans le chapitre 3. Nous avons fait l'observation que les feuilles sectionnées et alimentées en eau ne présentaient plus ce type de rythmes. L'origine du rythme est située probablement au niveau de l'absorption de l'eau par les racines. Nous constatons d'ailleurs qu'en atmosphère saturée en vapeur d'eau les oscillations de tous

Fig. 22. Effets des fortes concentrations en gaz carbonique sur le mouvement des stomates à l'obscurité.

a.s.n. = air sec normal.

Fig. 23. Réponse des stomates au passage des concentrations nulles en gaz carbonique aux fortes concentrations puis au retour à l'air normal.

Fig.22

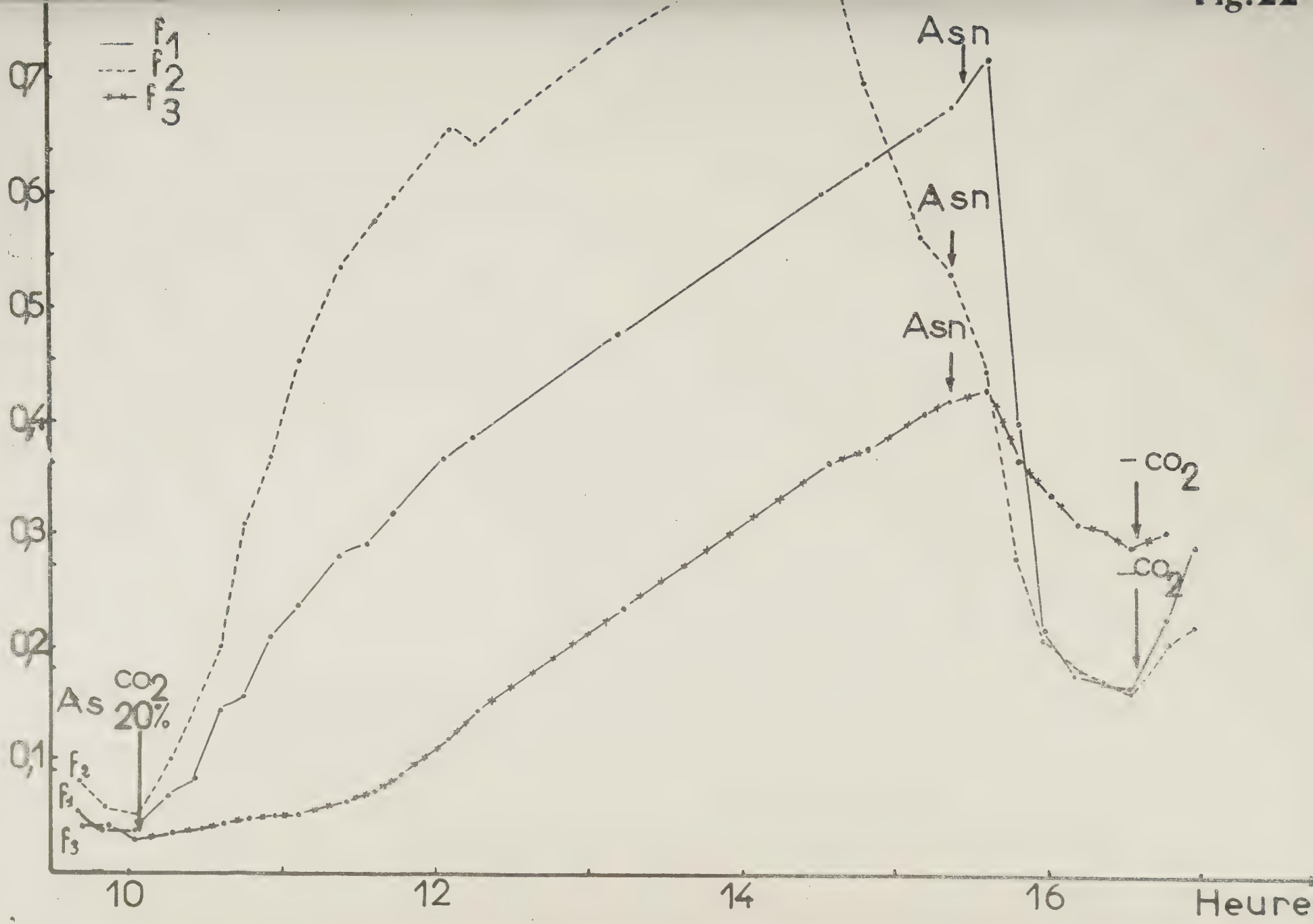
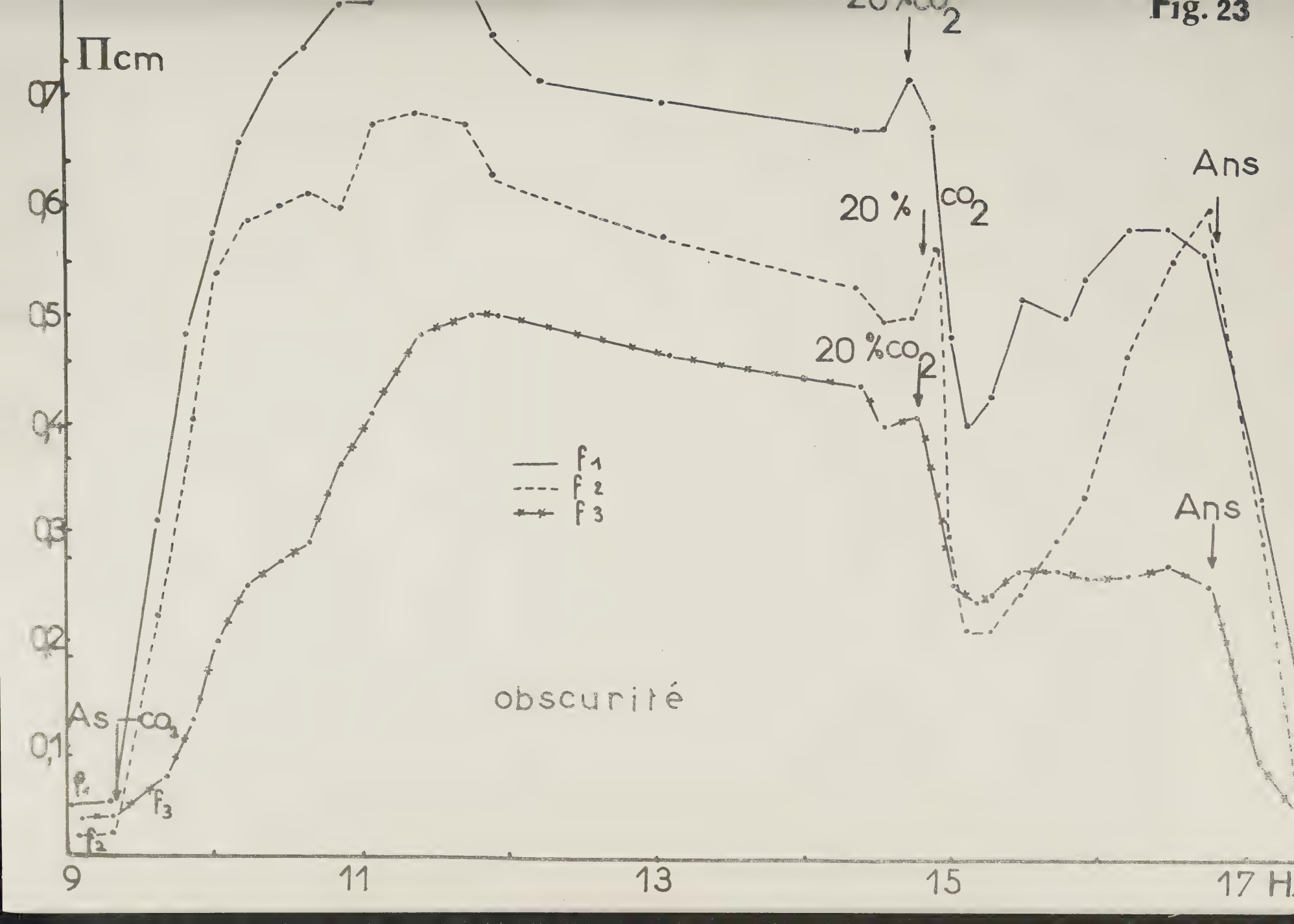

f1
f2
f3
Asn
Asn
Asn
- CO2
CO2
As
CO2
20%
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
10
12
14
16
Heure

Fig. 23


Пcm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
20 %CO2
20 % CO2
20 %CO2
Ans
Ans
f1
f2
f3
As CO2
obscurité
9
11
13
15
17 H

ordres sont considérablement atténuées, voire annulées. Nos observations trouvent une confirmation dans les travaux de BARRS et KLEPPER (1968) qui retrouvent également le même lien entre l'existence de rythmes et le degré de saturation de l'atmosphère.. Enfin il apparaît intéressant de remarquer que la période est d'autant plus courte que les stomates sont plus ouverts c'est-à-dire que la transpiration est plus intense ; ceci se vérifie entre les feuilles F_1 et F_2 (fig. 20) et pour la feuille F_1 lorsque ses stomates sont suffisamment fermés.

1-3. Effets des fortes concentrations en gaz carbonique.

Les stomates de *Pelargonium X hortorum* sont fermés à l'obscurité en air normal (teneur en gaz carbonique 0,03%) ; nous avons augmenté la teneur en gaz carbonique et nous avons constaté que les fortes concentrations en gaz carbonique agissent sur le degré d'ouverture stomatique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (LOUGUET, 1965).

Dans ce chapître nous nous proposons d'étudier de manière plus complète ce phénomène.

13-1. Sur le degré d'ouverture.

Nous avons examiné le rôle d'une concentration en gaz carbonique de 20%.

131-1. Réponse des stomates au passage de l'air normal à une atmosphère riche en gaz carbonique.

Le mélange air-gaz carbonique 20% est obtenu en enrichissant l'air par du gaz carbonique pur fourni sous un débit convenable. Un débitmètre à capillaire et un gyromètre permettent de vérifier la constance des débits.

La teneur en gaz carbonique est contrôlée par des dosages. Dans l'expérience décrite figure 22, les trois feuilles expérimentées présentent d'abord des stomates fermés en air normal. Lorsque cet air est remplacé par le mélange riche en gaz carbonique on observe une ouverture stomatique régulière qui permet d'atteindre finalement le degré d'ouverture maximum des stomates. Le retour en air normal entraîne immédiatement un mouvement de fermeture que la suppression du gaz carbonique permet d'arrêter puis d'inverser.

131-2. Réponse des stomates au passage de l'air dépourvu de gaz carbonique à une atmosphère riche en gaz carbonique.

Lorsque le degré d'ouverture des stomates en équilibre avec une teneur en gaz carbonique nulle est obtenu, on fournit le mélange enrichi en gaz carbonique 20% (fig.23). On observe une fermeture temporaire puis une réouverture. Le retour en air normal entraîne la fermeture.

131-3. Discussion et interprétation.

Les fortes teneurs en gaz carbonique provoquent une ouverture des stomates à l'obscurité. Ce phénomène qui n'a pas été décrit à notre connaissance est extrêmement curieux et soulève une foule de problèmes. Il est en effet classiquement admis que les teneurs élevées en gaz carbonique maintiennent les stomates fermés à l'obscurité. Un premier problème se pose : l'ouverture provoquée dans les conditions décrites ci-dessus est-elle une ouverture traduisant un phénomène physiologique normal ou bien n'est-ce pas la manifestation d'une altération du mécanisme des mouvements des stomates telle qu'on peut l'observer lors de l'utilisation de très fortes doses d'inhibiteurs. ZELITCH (1969), commentant ces résultats, estime que ces expériences semblent indiquer qu'il faille rejeter l'hypothèse du rôle prépondérant de la teneur en gaz carbonique dans le mouvement des stomates. Il me paraît nécessaire de nuancer cette interprétation. En premier lieu, nous remarquons que la fourniture d'air normal, ou d'air dépourvu de gaz carbonique (fig.22 et 23) permet de retrouver le comportement normal des stomates déjà connu. L'"effet toxique" éventuel serait donc immédiatement réversible. En second lieu, les observations concernant les effets de substances reconnues toxiques indiquent que la réponse des stomates est très généralement la fermeture. Il nous semble donc que le gaz carbonique n'est pas toxique dans les conditions de l'expérience. D'ailleurs, l'ouverture est encore observée avec 4 et 5% de gaz carbonique dans l'atmosphère.

Enfin les mêmes feuilles ont été utilisées dans des expériences ultérieures et les stomates avaient conservé leurs propriétés.

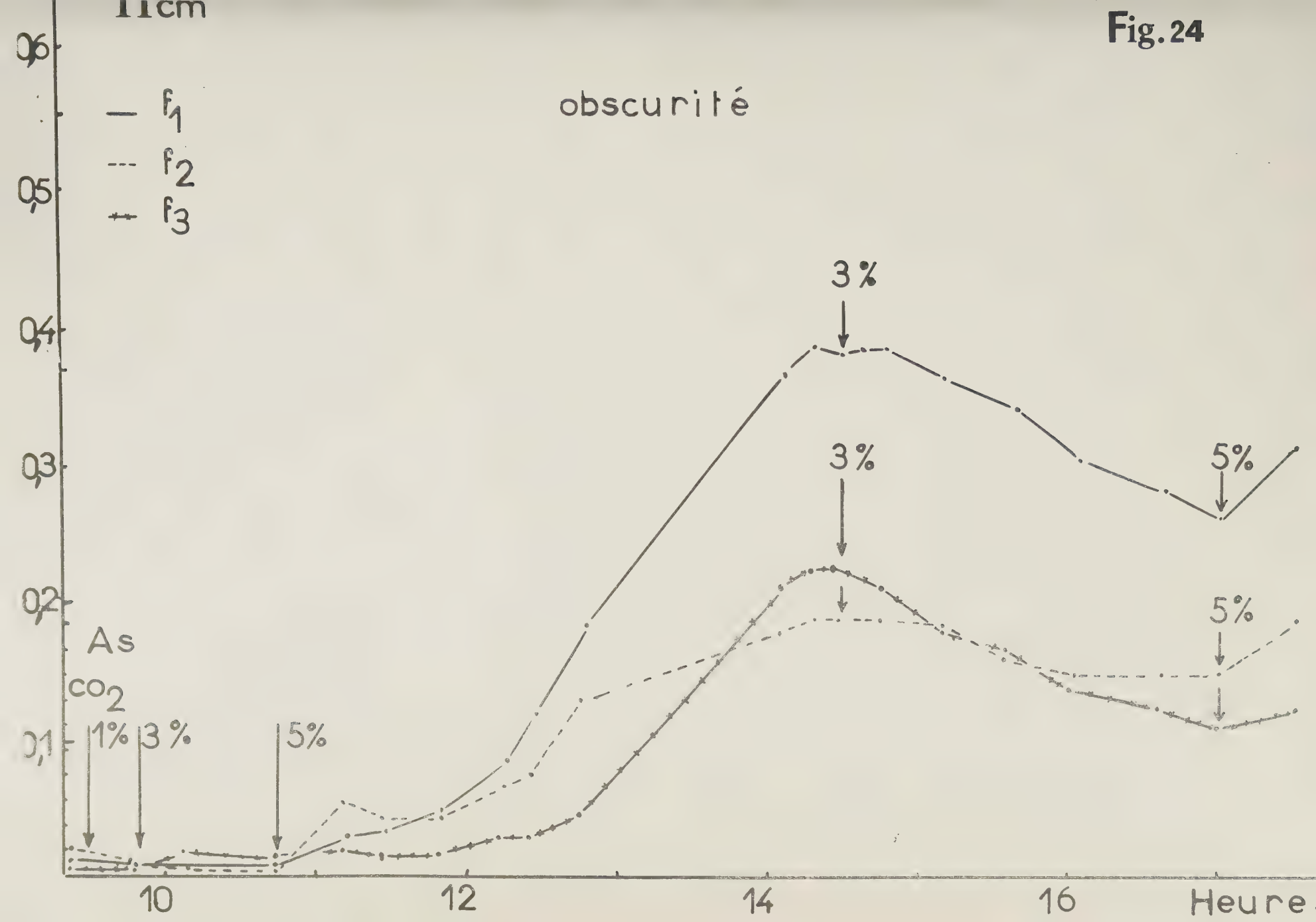
Nous savons que les stomates sont ouverts à 0 et 20% de gaz carbonique. Dans l'expérience décrite figure 23 on aurait donc pu s'attendre à ce que le passage de 0 à 20% n'entraîne pas de fermeture. Or, nous observons une fermeture temporaire. La lenteur de la diffusion des gaz doit permettre d'expliquer ce phénomène. En effet si la teneur en gaz carbonique varie presque instantanément dans l'atmosphère autour des feuilles il n'en n'est probablement pas de même dans les cellules stomatiques. Lorsque la concentration en gaz carbonique augmente, on part donc de teneurs voisines de 3.10^{-4} qui normalement entraînent une fermeture des stomates ; ensuite on dépasse cette zone et l'action des fortes teneurs peut se manifester de nouveau ce qui provoque la réouverture. La durée de la période de fermeture renseigne à notre sens sur le temps nécessaire (30 à 40 mn) pour que le gaz carbonique atteigne dans les cellules la concentration favorable à l'ouverture.

L'expérience inverse, c'est-à-dire l'envoi du mélange en gaz carbonique puis d'air dépourvu de ce gaz conduit au même résultat. La fermeture immédiate en air normal montre bien que le mécanisme de fermeture n'est pas altéré.

Quoi qu'il en soit, on peut se demander quel est le mode d'action des fortes teneurs en gaz carbonique. Le problème est d'autant plus difficile à résoudre qu'on ne connait pas le mode d'action du gaz carbonique pour les faibles teneurs. Nous ne pouvons donc que comparer entre eux les deux types d'ouverture à 0 et 20% de gaz carbonique. Si l'on répète ces expériences on constate que le degré d'ouverture maximal obtenu dans l'un et l'autre cas n'est pas sensiblement différent.

Fig. 24. Détermination de la gamme des teneurs en gaz carbonique compatible avec la fermeture des stomates.

Fig. 24


11cm
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
— f1
--- f2
-+- f3
obscurité
3%
3%
5%
5%
As
CO2
1%
3%
5%
10
12
14
16
Heure

Il paraît critiquable de tirer argument des effets du gaz carbonique aux fortes concentrations pour nier tout rôle physiologique important à celui-ci dans la gamme des teneurs $0-3.10^{-4}$. Il semble raisonnable d'éviter dans l'état actuel de nos connaissances d'émettre une opinion définitive sur le rôle du gaz carbonique dans le mouvement des stomates. Remarquons que les expériences décrites plus haut semblent apporter un démenti partiel à l'hypothèse classique qui explique la fermeture des stomates en présence de gaz carbonique par une diminution du pH des cellules stomatiques. En effet, on peut supposer que de plus fortes concentrations en gaz carbonique entraîneraient un abaissement du pH plus important ; cependant les stomates s'ouvrent !

Puisque les stomates s'ouvrent aux faibles et aux fortes concentrations il semble donc qu'il existe une gamme de teneurs en gaz carbonique qui semble maintenir les stomates fermés à l'obscurité. La limite inférieure en est connue 3.10^{-4}, on peut rechercher qu'elle est la limite supérieure ?

131-4. Détermination de la limite supérieure de teneur en gaz carbonique de l'air compatible avec la fermeture à l'obscurité.

1314-1. Expérience (fig. 24).

Sur des stomates fermés on fait agir des mélanges de teneurs croissantes en gaz carbonique en attendant suffisamment pour que la concentration en gaz carbonique des cellules puisse s'équilibrer avec l'atmosphère de balayage. On obtient l'ouverture avec 5% de gaz carbonique après un temps de latence d'une heure environ ; la fourniture du mélange à 3% entraîne une fermeture lente mais nette. Le retour à 5% provoque une réouverture.

1314-2. Discussion.

Le temps de latence observé peut s'interpréter comme le temps nécessaire pour que la concentration en gaz carbonique atteigne dans les cellules la teneur permettant l'ouverture. Il ne faut pas cependant rejeter l'hypothèse de l'intervention d'un mécanisme biochimique cette fois (et non plus physique) qui dépendrait de la teneur en gaz carbonique.Pour les teneurs faibles (3%) le mécanisme permettant d'aboutir à l'ouverture serait très lent, son déroulement étant favorisé par l'augmentation des teneurs. Puisque la concentration de 3% de gaz carbonique ne peut maintenir l'ouverture, on peut penser que dans cette expérience, la limite supérieure de la zone de fermeture est de 4% environ.

Plusieurs séries d'expériences ont montré que cette limite pouvait varier suivant les feuilles et les conditions entre 2 et 4%. Nous avons vu que, pour les fortes teneurs en gaz carbonique, il étéait possible d'obtenir, comme pour les teneurs nulles, le degré d'ouverture maximum des stomates. Toutefois il apparaît que les vitesses d'ouverture sont modifiées. Il est donc nécessaire de préciser les relations qui existent entre la vitesse d'ouverture et les fortes teneurs en gaz carbonique.

13-2. Influence des fortes teneurs en CO_2 sur la vitesse d'ouverture.

Afin de préciser les particularités du rôle des fortes teneurs en gaz carbonique, nous avons comparé les vitesses d'ouverture des stomates pour quelques teneurs en gaz carbonique, et nous avons calculé les moyennes des rapports :

$$\frac{\text{vitesse d'ouverture à x\%}}{\text{vitesse d'ouverture à 0\%}}$$

132-1. Conditions expérimentales.

Les feuilles sont soumises aux conditions expérimentales habituelles (obscurité, température 20°C). L'ouverture des stomates est obtenue en présence des teneurs en gaz carbonique suivantes : 0, 5, 10, 15, 20%. On détermine la vitesse maximum d'ouverture mesurée par le maximum d'accroissement de Π pendant une heure. Nous avons calculé la valeur du rapport vitesse d'ouverture à x% d'une feuille sur la vitesse d'ouverture à 0% de la même feuille, ce qui permet d'éliminer les variations entre feuilles. Puis nous avons fait la moyenne de ces rapports.

132-2. Résultats.

Ils sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Concentrations	5 %	10 %	15 %	20 %
$\frac{V\ x\ \%}{V\ 0\ \%}$	0,53	0,70	0,95	0,69

132-3. Interprétation.

Nous constatons que le rapport croît jusqu'à 15% de teneur en gaz carbonique. Il est donc possible de trouver une teneur en gaz carbonique se situant aux environs de 15% pour laquelle la *vitesse d'ouverture est égale à la vitesse d'ouverture en air dépourvu de gaz carbonique à l'obscurité*. Ceci nous renforce dans nos convictions que le gaz carbonique est capable aux fortes teneurs d'assurer le mécanisme d'ouverture aussi bien qu'en son absence.

Fig. 25. Courbes représentatives de l'ouverture des stomates en présence de lumière et d'air normal. Etude des effets de la suppression du gaz carbonique puis de la lumière.

- Les feuilles étudiées sont les mêmes que celles de la fig. 18.

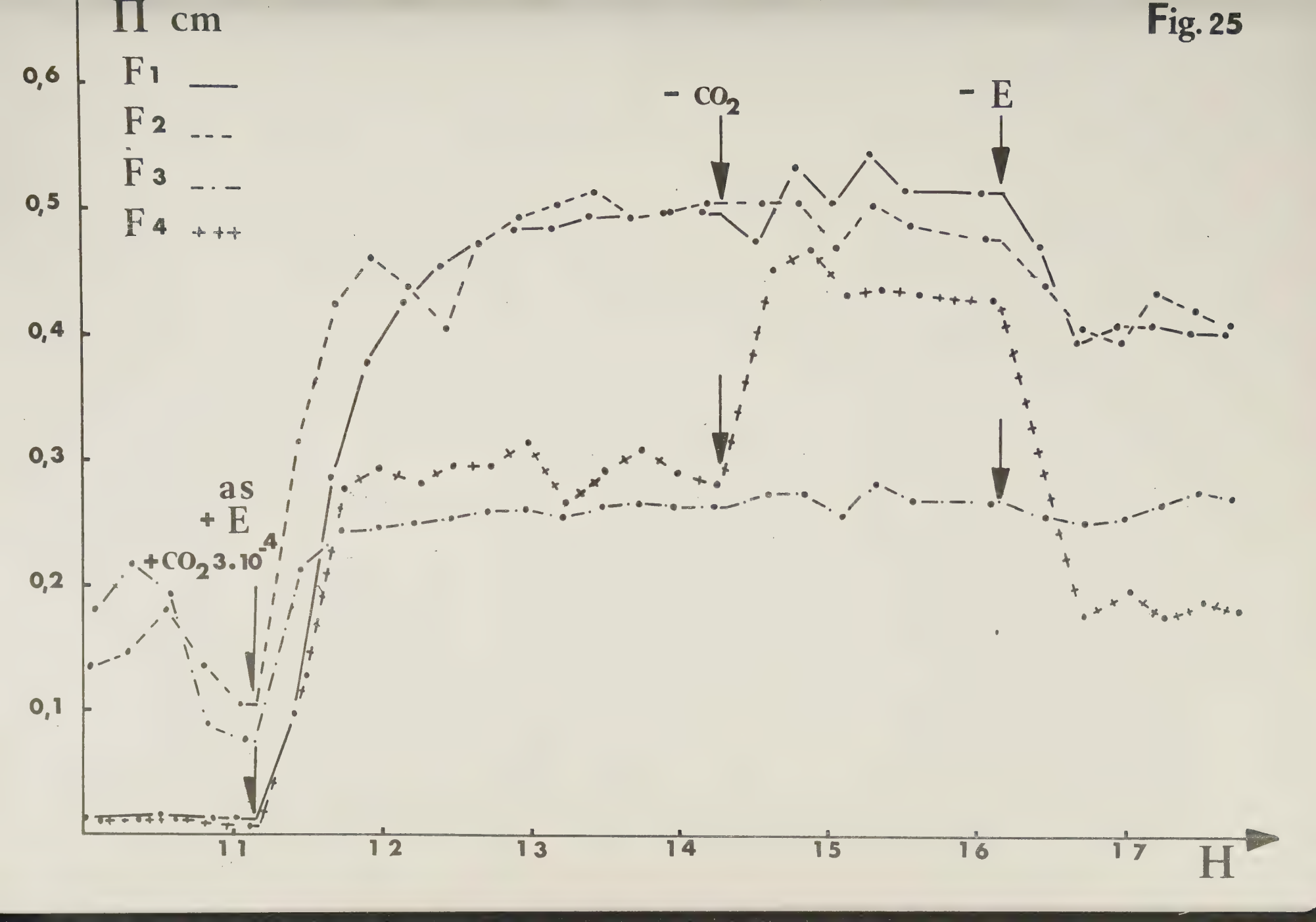

Π cm
F1
F2
F3
F4
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
- CO2
- E
as
+ E
+CO2 3.10-4
11
12
13
14
15
16
17
H

Fig. 25

La diminution du rapport n'apparaît que vers 20% de teneur en gaz carbonique et nous constatons parfois que le degré d'ouverture maximal n'est plus atteint. Il suffit de revenir à ce moment là au mélange à 10% pour que l'ouverture reprenne. Donc jusqu'à ce qu'on atteigne la vitesse maximale (15%) il ne semble pas que le gaz carbonique agisse comme une substance toxique à ces doses puisque l'effet de toxicité apparaît clairement pour les teneurs supérieures. Bien entendu, la valeur absolue de la teneur en gaz carbonique n'intervient pas seule, le temps de fourniture du mélange enrichi en CO_2 détermine également le seuil de toxicité.

Il semble donc que le gaz carbonique agisse spécifiquement sur le mécanisme du mouvement des stomates, que ce soit pour une concentration nulle ou pour les fortes teneurs. Le mécanisme de cette action est complètement inconnu. Cependant pour ces fortes teneurs, le gaz carbonique doit se comporter non seulement comme donneur éventuel de groupement carboxyle mais également comme anhydride d'acide donneur de protons pouvant entraîner des variations de pH importantes.

2- MODIFICATION DU MOUVEMENT DES STOMATES A LA LUMIERE.

2-1. Influence de la lumière sur l'ouverture des stomates en présence de CO_2 (teneur 0,03%) et en son absence.

21-1. Effets des passages successifs des conditions (+E + CO_2) à (+ E - CO_2) et (-E - CO_2) sur la vitesse et le degré d'ouverture.

211-1. Conditions de l'expérimentation.

L'expérience décrite figure 25 porte sur les mêmes feuilles que celle décrite figure 18. L'air sec de teneur en gaz carbonique 3.10^{-4} est fourni à l'obscurité. Puis les feuilles sont éclairées sous une intensité moyenne de 5.000 lux. Dans un deuxième temps le gaz carbonique est supprimé ; enfin les feuilles retournent à l'obscurité.

211-2. Résultats.

Les stomates s'ouvrent en présence de lumière et de gaz carbonique comme dans les conditions naturelles. Remarquons que la suppression du gaz carbonique entraîne pour F_4 un surcroît d'ouverture sensible. Le retour à l'obscurité en l'absence de gaz carbonique n'entraîne pas la fermeture des stomates mais une diminution variable du degré d'ouverture. Il est intéressant d'effectuer la comparaison entre les vitesses d'ouverture ($\Delta\Pi_1$) et les maximums (Π max) obtenus pour les mêmes feuilles soumises aux conditions des figures 18 et 25.

Les résultats sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II.

Conditions d'ouverture	F_1		F_2		F_3		F_4	
	$\Delta\Pi_1$	Πmax	$\Delta\Pi_1$	Πmax	$\Delta\Pi_1$	Πmax	$\Delta\Pi_1$	Πmax
Obscurité - CO_2	0,28	0,44	0,42	0,46	0,44	0,50	0,20	0,27
Lumière + CO_2	0,41	0,50	0,33	0,50	0,17	0,33	0,27	0,30

Il apparaît que les vitesses d'ouverture à l'obscurité sont soit supérieures à celles observées en présence de lumière (F_2-F_3) soit inférieures (F_1 et F_4). Les maximums obtenus à la lumière sont supérieurs à l'exception de F_3. Compte tenu de la variabilité importante des vitesses d'ouverture que nous étudierons ultérieurement il n'apparaît pas de différences significatives entre les vitesses d'ouverture à l'obscurité et à la lumière dans nos conditions expérimentales.

Les maximums obtenus à la lumière sont le plus souvent légèrement supérieurs.

21-2. Effets des conditions précédentes sur le degré d'ouverture maximum.

Les maximums d'ouverture obtenus pour une série de 4 feuilles soumises aux trois conditions d'ouverture : 1) obscurité - CO_2 ; 2) lumière + CO_2 3.10^{-4} ; 3) lumière - CO_2 sont les suivantes (tableau III) :

TABLEAU III.

	F_1	F_2	F_3	F_4
	Πmax	Πmax	Πmax	Πmax
1)	0,59	0,37	0,73	0,50
2)	0,51	0,35	0,43	0,30
3)	0,54	0,47	0,64	0,40

Fig. 26. Effets de la suppression ($-CO_2$) puis de la fourniture de gaz car
($+ CO_2$ 3.10^{-4}) en présence de lumière, sur les variations du deg
d'ouverture des stomates.

Fig. 27. Effet de la fourniture (+E) et de la suppression (-E) de la lumi
sur le degré d'ouverture des stomates en présence d'air dépourvu
gaz carbonique (as - CO_2).

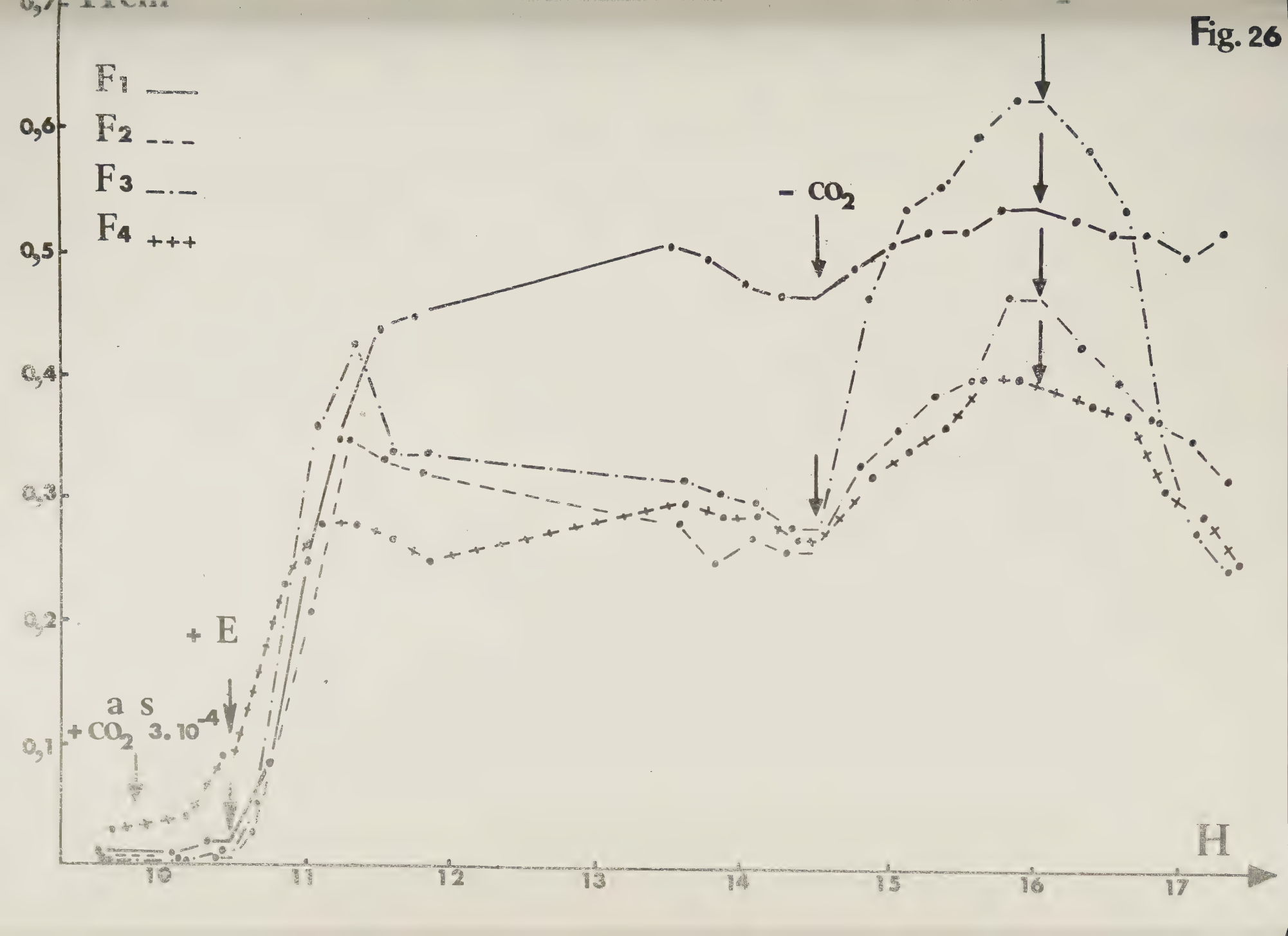


Fig. 26
F1 ——
F2 – – –
F3 —·—
F4 +++
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
– CO2
+ E
a s
+ CO2 3. 10-4
H
10
11
12
13
14
15
16
17

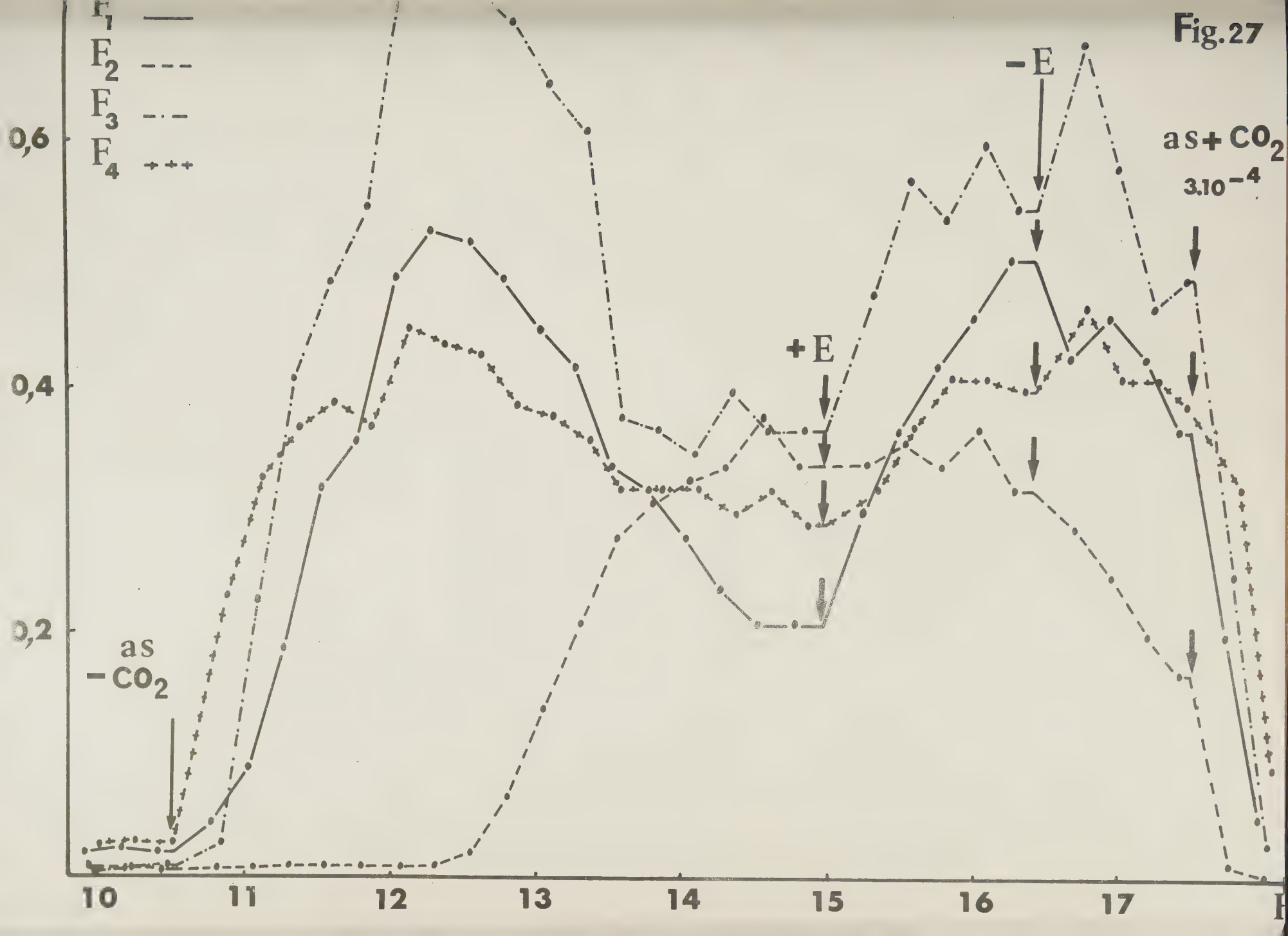


Fig. 27

Il apparaît que les maximums sont tantôt supérieurs tantôt inférieurs suivant les différents cas. Remarquons qu'il s'agit de maximums absolus. En effet à l'obscurité en air sec dépourvu de gaz carbonique les stomates se referment légèrement (fig. 18) après avoir atteint le maximum alors qu'en présence de lumière les stomates restent ouverts à leur degré d'ouverture maximal (fig. 25).

21-3. Obtention d'un accroissement du degré d'ouverture.

Une fois obtenu le degré d'ouverture en équilibre avec les conditions externes on peut obtenir un surcroît d'ouverture de deux manières. Si l'on se trouve en présence de lumière et de gaz carbonique, la suppression du gaz carbonique entraîne un surcroît d'ouverture (fig. 26). De même, partant de l'obscurité et en l'absence de gaz carbonique la fourniture de lumière entraîne un accroissement du degré d'ouverture (fig. 27).

21-4. Interprétation et discussion.

Lorsqu'on réalise un nombre d'expériences suffisant, on peut dégager les grandes lignes des interactions lumière- gaz carbonique. Les vitesses d'ouverture dans nos différentes conditions expérimentales ne semblent pas varier de manière significative, les maximums absolus non plus. Toutefois il est possible d'obtenir un accroissement du degré d'ouverture dans les conditions décrites précédemment sous réserve que les stomates ne soient pas en équilibre à leur degré d'ouverture maximal absolu. Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse du rôle indirect de la lumière mentionné dans notre introduction. Cette hypothèse déjà ancienne, d'abord formulée par SCARTH (1932), a reçu par la suite de nombreux supports expérimentaux notamment par FREUDENBERGER (1940) puis de manière extensive par HEATH (1948-1950), HEATH et MILTHORPE (1950) HEATH et RUSSEL (1954a et b). On peut objecter qu'en l'absence de gaz carbonique dans l'air de balayage, la lumière ne peut pas entraîner une diminution de cette teneur et cependant les stomates s'ouvrent légèrement (fig. 27).

A notre sens, et selon ZELITCH (1969), la teneur en gaz carbonique au niveau des cellules stomatiques à l'obscurité et en air dépourvu de gaz carbonique n'est probablement pas nulle, compte tenu de l'émission de gaz carbonique par la respiration. La fourniture de lumière pourrait donc entraîner une diminution nouvelle de cette teneur par consommation photosynthétique. Cependant il est possible d'interprêter de manière différente le rôle de la lumière qui agirait directement sur le degré d'ouverture des stomates. L'expérience ne permet pas de trancher. La comparaison des courbes d'ouverture à l'obscurité et à la lumière met tout de même en évidence une différence significative. Si, comme nous l'avons déjà montré, les vitesses d'ouverture et les maximums absolus ne sont pas différents à l'obscurité et à la lumière, par contre le maintien de l'ouverture stomatique une fois le maximum absolu dépassé, est beaucoup plus aisé en présence de lumière qu'à l'obscurité.

Cette observation conduit donc à penser que les conditions requises pour entraîner l'ouverture des stomates ne sont pas obligatoirement les mêmes que celles autorisant le maintien prolongé de l'ouverture maximale, nous rejoignons en cela l'interprétation de MEIDNER et MANSFIELD (1968).

Fig. 28. Effets des interactions entre la lumière et les fortes teneurs e gaz carbonique sur le degré d'ouverture des stomates.

Fig. 29. Effet de la fourniture de lumière sur l'ouverture des stomates lorsque la concentration en gaz carbonique est à la limite supérieure de la gamme des concentrations qui maintiennent les stomates fermés.

Fig. 30. Effets de l'augmentation de l'intensité de l'éclairement (E_1 pui E_2) sur le degré d'ouverture des stomates en présence de fortes teneurs en gaz carbonique.

Fig. 28

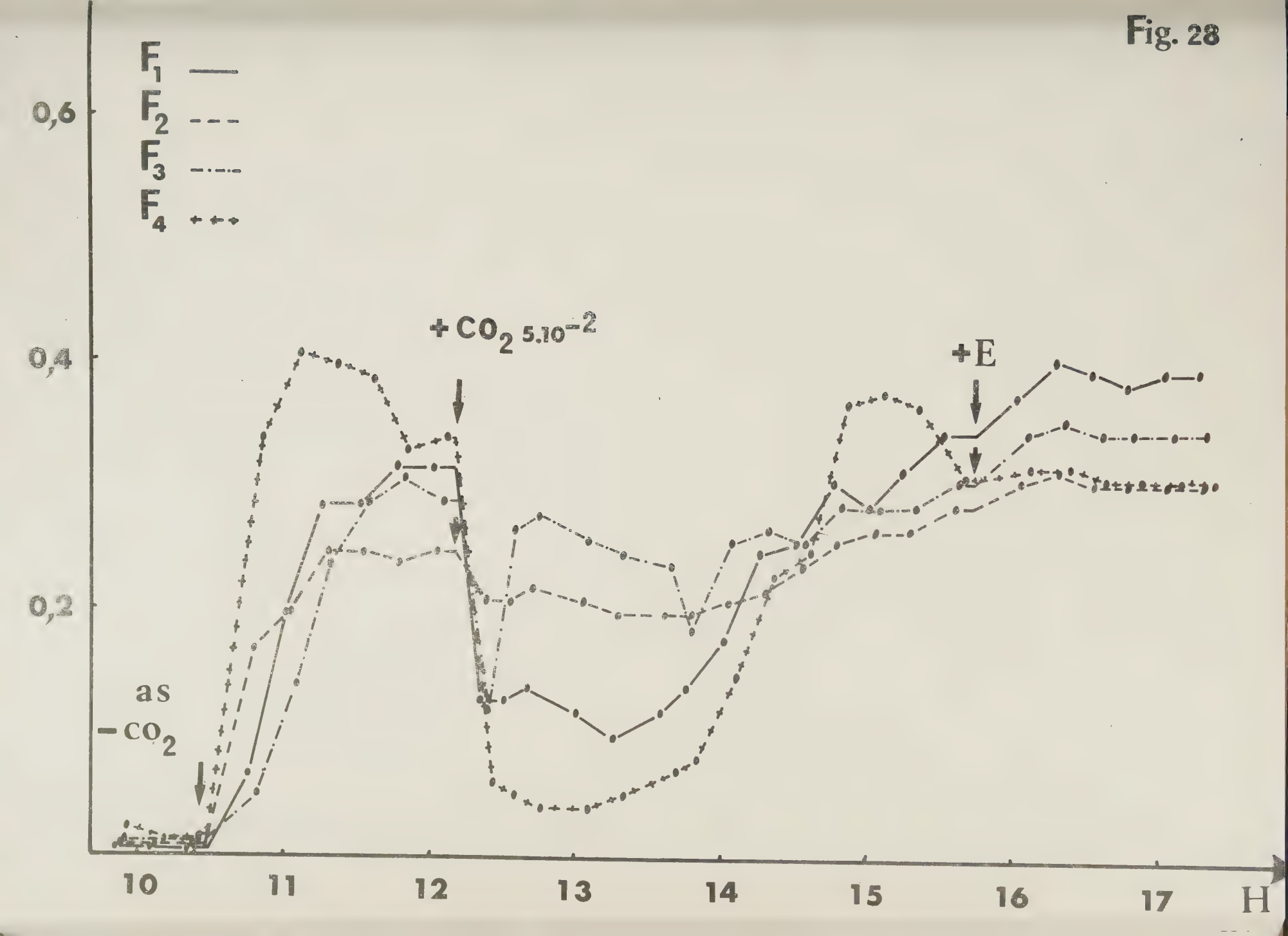
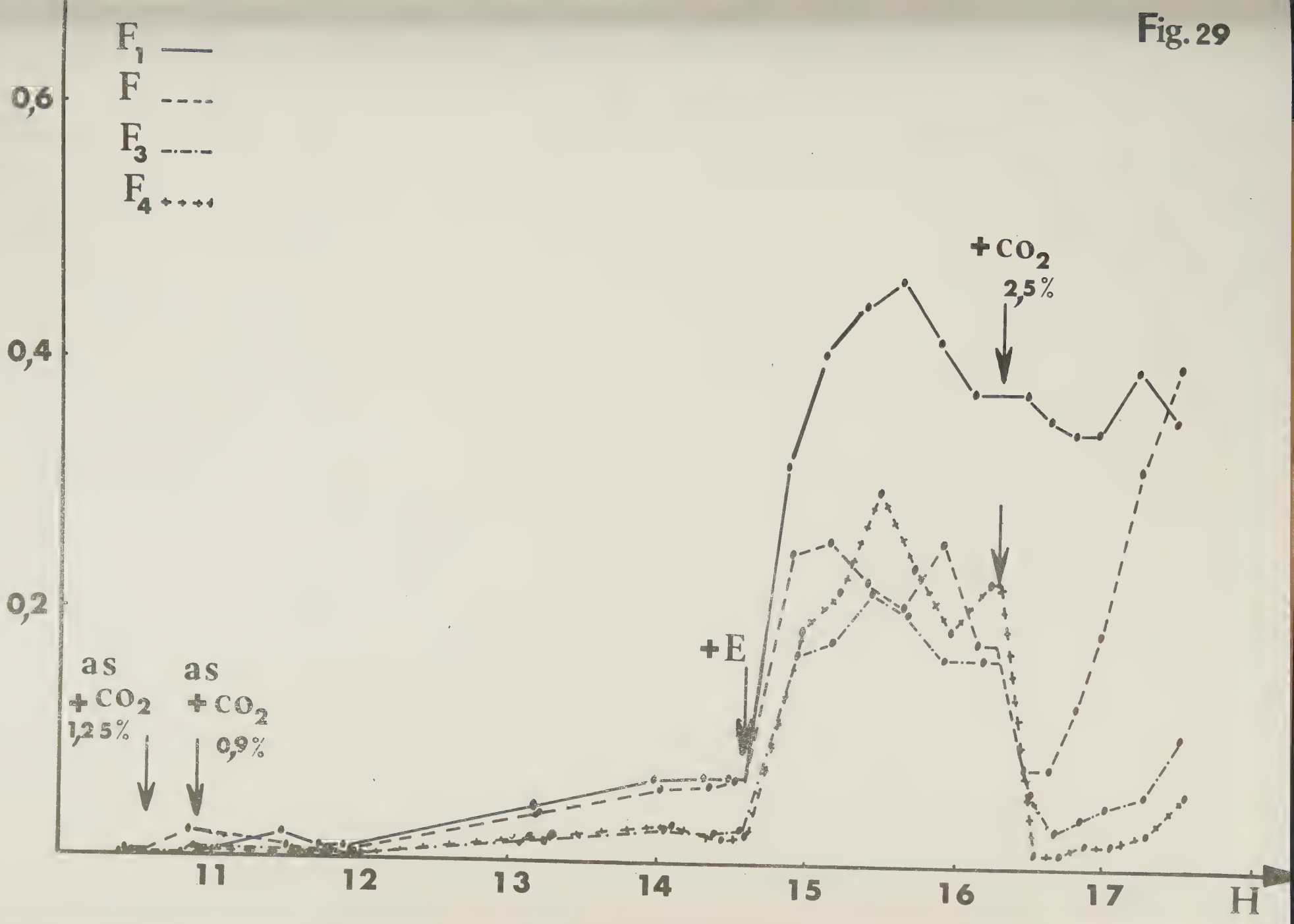
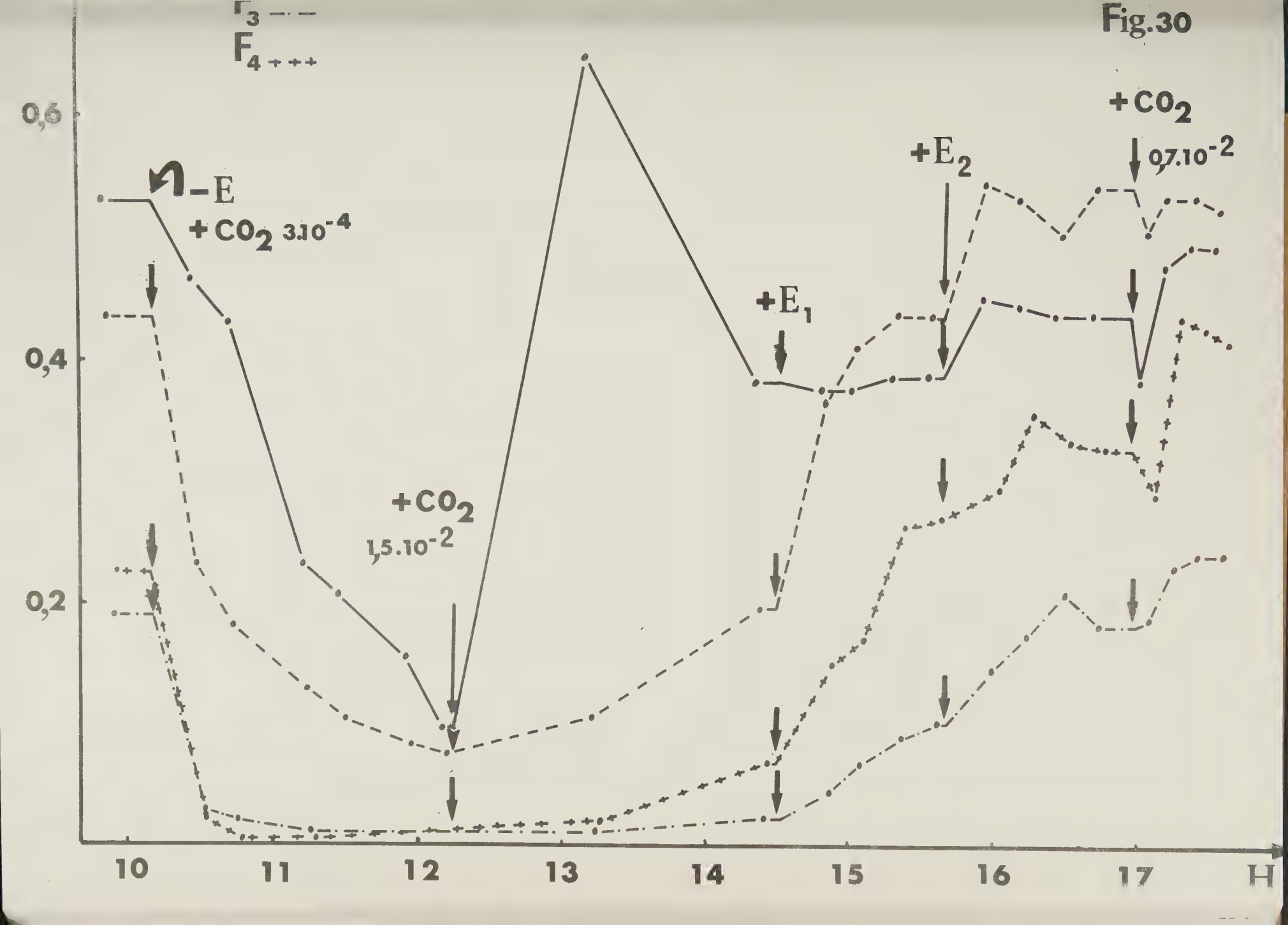


Fig. 29




F3 - - -
F4 + + +
Fig.30
0,6
0,4
0,2
-E
+CO2 3.10-4
+CO2
1,5.10-2
+E1
+E2
+CO2
0,7.10-2
10
11
12
13
14
15
16
17
H

Quoi qu'il en soit, il est raisonnable de penser que chez le *Pelargonium X hortorum* au moins, le mécanisme du mouvement des stomates lié aux variations de la teneur en gaz carbonique de l'air dans les limites physiologiques (de 0 à 0,03%) est le plus important. Ce mécanisme, même s'il n'est pas le seul en cause dans le mouvement des stomates, justifie à notre sens une étude approfondie. Cette étude présente en outre l'avantage de ne faire intervenir qu'un seul facteur, les variations de la teneur en gaz carbonique à l'obscurité, alors qu'en présence de lumière deux facteurs au moins peuvent intervenir simultanément.

2-2. Etude des interactions lumière- fortes teneurs en gaz carbonique sur le mouvement des stomates.

22-1. Première expérience (fig. 28).

Dans l'expérience décrite figure 28 on fait d'abord ouvrir les stomates en air sec dépourvu de gaz carbonique puis le mélange à 5% de gaz carbonique est fourni, les stomates se ferment temporairement puis s'ouvrent à nouveau. Lorsque le maximum d'ouverture est obtenu on fournit de la lumière, on observe un surcroît d'ouverture faible pour F_1 et F_3 rien pour F_2 et F_4.

22-2. Deuxième expérience (fig. 29).

A l'obscurité, le mélange à 0,9% n'entraîne pas d'ouverture immédiate. Toutefois après deux heures de balayage les stomates s'ouvrent très lentement et régulièrement. Lorsque la lumière est fournie les stomates s'ouvrent immédiatement ; une fois le degré d'ouverture maximum en équilibre avec les conditions extérieures obtenu, on augmente la teneur en gaz carbonique ; les stomates de F_2, F_3, F_4 se ferment puis s'ouvrent, ceux de F_1 présentent une fermeture très légère.

22-3. Troisième expérience (fig. 30).

Dans cette expérience, les stomates sont ouverts au maximum en présence de lumière et d'air contenant 0,03% de gaz carbonique. Le retour à l'obscurité entraîne une fermeture normale des stomates. Le mélange à 1,5% de gaz carbonique entraîne une ouverture marquée pour F_1, limitée pour F_2, F_3, F_4. Deux éclairements d'intensité croissante sont alors fournis E_1 (2.000 lux) et E_2 (5.000 lux environ). Le degré d'ouverture croît ; la fourniture d'un mélange à 0,7% entraîne à nouveau un surcroît d'ouverture.

22-4. Discussion et interprétation.

La première partie de la première expérience est équivalente à l'expérience décrite figure 23. La lumière est fournie pratiquement lorsque le maximum d'ouverture est obtenu. On ne peut donc pas s'attendre à un accroissement important du degré d'ouverture. Le maximum obtenu finalement est tout à fait comparable à celui qu'on obtiendrait en air dépourvu de gaz carbonique et à la lumière (voir fig. 27). On peut penser raisonnablement que la consom-

mation photosynthétique éventuelle de gaz carbonique ne modifie pas sensiblement la teneur des cellules en équilibre avec les 5% de l'atmosphère et on se trouve au-dessus de la limite inférieure des fortes teneurs en gaz carbonique qui entraînent l'ouverture (voir fig. 24), que se passe-t-il à la limite ?

Dans l'expérience décrite fig. 29 on cherche à se placer au voisinage de cette limite. En effet si l'on obtient un faible degré d'ouverture à l'obscurité en présence de 0,9% de gaz carbonique, on peut formuler l'hypothèse que la fourniture de lumière entraînerait une diminution de la teneur en gaz carbonique des cellules et, comme on se trouve à la limite, on atteindrait ainsi la zone des teneurs en gaz carbonique qui maintiennent la fermeture. Or il n'en est rien ; même à la limite, la fourniture de lumière entraîne une ouverture. On pourrait penser alors que, lorsqu'on se place au voisinage de la limite inférieure des fortes teneurs en gaz carbonique, cette fois, la *photosynthèse serait assez importante pour que la teneur en gaz carbonique atteigne dans les cellules stomatiques les valeurs qui permettent l'ouverture (inférieure à 0,02%)*.

Il suffirait donc d'augmenter progressivement cette teneur en gaz carbonique au-dessus de la limite 1% pour obtenir finalement un mouvement de fermeture en présence de lumière. *Nous n'avons jamais obtenu de mouvement de fermeture lorsqu'on fournit la lumière*. Par contre, il faut remarquer que le degré d'ouverture obtenu dans ces conditions est inférieur au degré d'ouverture maximum possible au moins pour F_2, F_3 et F_4. Il est donc possible de trouver une teneur en gaz carbonique qui limite le degré d'ouverture des stomates *en présence de lumière*. La fermeture temporaire obtenue en présence de 2,5% de gaz carbonique pourrait s'expliquer selon l'hypothèse avancée plus haut. En effet, l'augmentation progressive *dans les cellules* de la teneur en gaz carbonique ferait passer d'abord les stomates d'une zone d'ouverture à celle de fermeture puis à celle de réouverture comme on l'observe à l'obscurité (fig. 28). Mais on observe exactement le même phénomène lorsqu'on passe d'une teneur de 1% à l'obscurité puis ouverture à la lumière et augmentation ensuite de la teneur en gaz carbonique jusqu'à 1,25%. Or si on peut penser qu'à l'obscurité en présence de 2,5% de CO_2 les stomates sont ouverts, ils ne le sont pas à 1,25%. Par conséquent, il n'est pas possible d'expliquer de cette manière la réouverture observée après la fermeture temporaire. On est donc obligé d'admettre une certaine indépendance entre l'action de la lumière et celle du gaz carbonique. On peut penser que l'ouverture observée, *quelle que soit la teneur en gaz carbonique*, lorsqu'on fournit la lumière, constituerait un argument en faveur de l'hypothèse du *rôle direct de la lumière*. Toutefois *l'intervention directe* ne peut suffire à expliquer l'ouverture complète des stomates. Nous constatons que toute variation de la teneur en gaz carbonique retentit immédiatement sur le degré d'ouverture des stomates aux fortes concentrations à la lumière. *Il apparaît que le maintien du degré d'ouverture dépend étroitement de la lumière et que sa modification par toute variation de la teneur en gaz carbonique est suivie d'un retour à l'équilibre initial par suite d'un mécanisme compensateur*. Nous retrouvons là encore l'hypothèse selon laquelle les mouvements d'ouverture et de fermeture seraient plutôt liés aux variations de la teneur en gaz carbonique alors que la lumière permettrait plutôt le maintien du degré d'ouverture. L'expérience décrite fig. 30 montre que l'accroissement de la quantité d'énergie lumineuse reçue par la feuille entraîne un accroissement du degré d'ouverture. Tout se passe comme si l'accroissement des fortes teneurs en gaz carbonique au-dessus de la limite de

1 à 2% produisait les mêmes effets sur le mouvement des stomates que la diminution des faibles teneurs au-dessous de 3.10^{-4}.

Quoi qu'il en soit, ces expériences mettent en évidence à notre sens les insuffisances des hypothèses reposant sur l'intervention soit de la lumière seule (action directe), soit du gaz carbonique (action indirecte de la lumière). Toutefois la nature des interactions entre la lumière et le gaz carbonique reste à élucider.

CONCLUSIONS PARTIELLES.

Il ressort clairement des expériences décrites dans les paragraphes 1 et 2 que chez le *Pelargonium X hortorum* au moins :

- la teneur en gaz carbonique de l'air est l'un des facteurs qui contrôlent étroitement le degré d'ouverture des stomates. Les stomates s'ouvrent à l'obscurité pour les teneurs en gaz carbonique inférieures à 0,02% et supérieures à 2% environ.

- La fourniture de lumière provoque toujours une ouverture des stomates quelle que soit la teneur en gaz carbonique (à condition évidemment que les stomates ne soient pas ouverts auparavant à leur maximum). Chez le *Pelargonium X hortorum* il semble que l'absence de gaz carbonique soit capable d'assurer à l'obscurité la même vitesse et le même degré d'ouverture qu'à la lumière. Toutefois le maintien d'un degré d'ouverture est meilleur en présence de lumière qu'en son absence. Cette constatation nous conduit à penser que les mécanismes d'ouverture et de fermeture seraient plutôt liés aux variations des teneurs en gaz carbonique, le maintien du degré d'ouverture plutôt lié à la présence de lumière. L'examen du rôle de la lumière en présence de fortes teneurs en gaz carbonique conduit à envisager une certaine indépendance entre l'action de la lumière et celle du gaz carbonique, en accord avec les résultats des expériences concernant le rôle privilégié des radiations bleues (MEIDNER et MANSFIELD, 1966).

3- EFFETS DE LA TENEUR EN VAPEUR D'EAU DE L'ATMOSPHERE.

Les expériences décrites précédemment ont été effectuées en air sec. Il apparaît donc nécessaire de justifier ce choix. On sait depuis très longtemps grâce à MOHL (1856), que la différence de turgescence entre les cellules stomatiques et les cellules compagnes détermine le degré d'ouverture des stomates. Tout facteur perturbant la teneur en eau de la plante risque donc de le modifier. Ainsi YEMM et WILLIS (1954) montrent qu'un déficit hydrique croissant entraîne une fermeture des stomates de plus en plus importante. Ce déficit hydrique peut trouver son origine soit dans une diminution de la fourniture d'eau à la plante soit dans une augmentation trop importante du rejet de l'eau, essentiellement par la transpiration. Dans nos expériences, nous modifierons uniquement le pouvoir évaporant de l'air de balayage des feuilles, la teneur en eau du sol étant à

Fig. 31. Courbes représentatives des variations du degré d'ouverture des stomates en fonction du temps provoquées par la fourniture d'air humidifié dépourvu de gaz carbonique (a.h.-CO_2) puis retour en air normal humidifié (a.h. + CO_2 3.10^{-4}). Les feuilles étudiées sont les mêmes que celles de la fig. 18.

Fig. 32. Expérience comparable à celle de la fig. 25, l'air sec étant remplacé par l'air humidifié.

Fig. 31

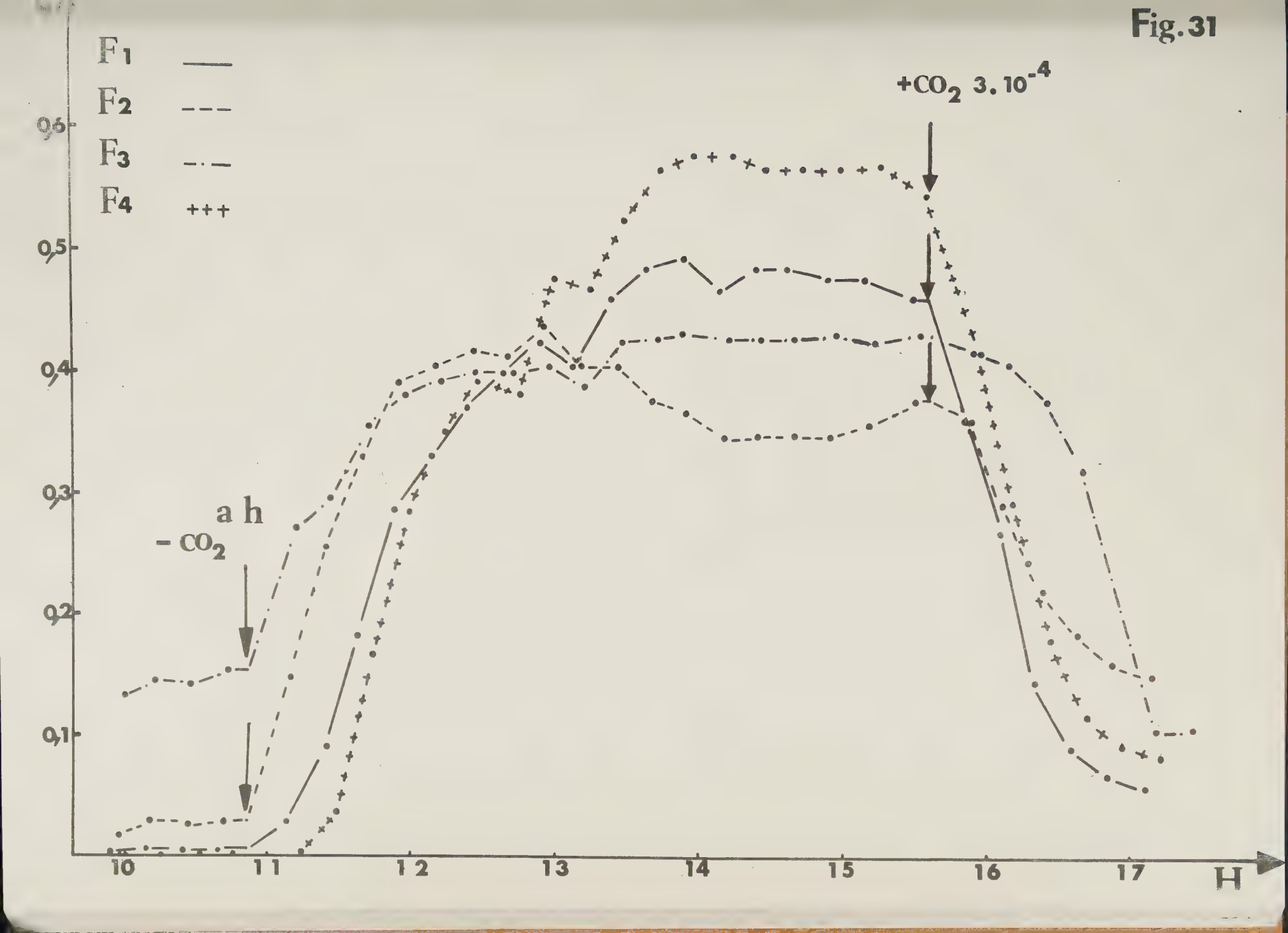
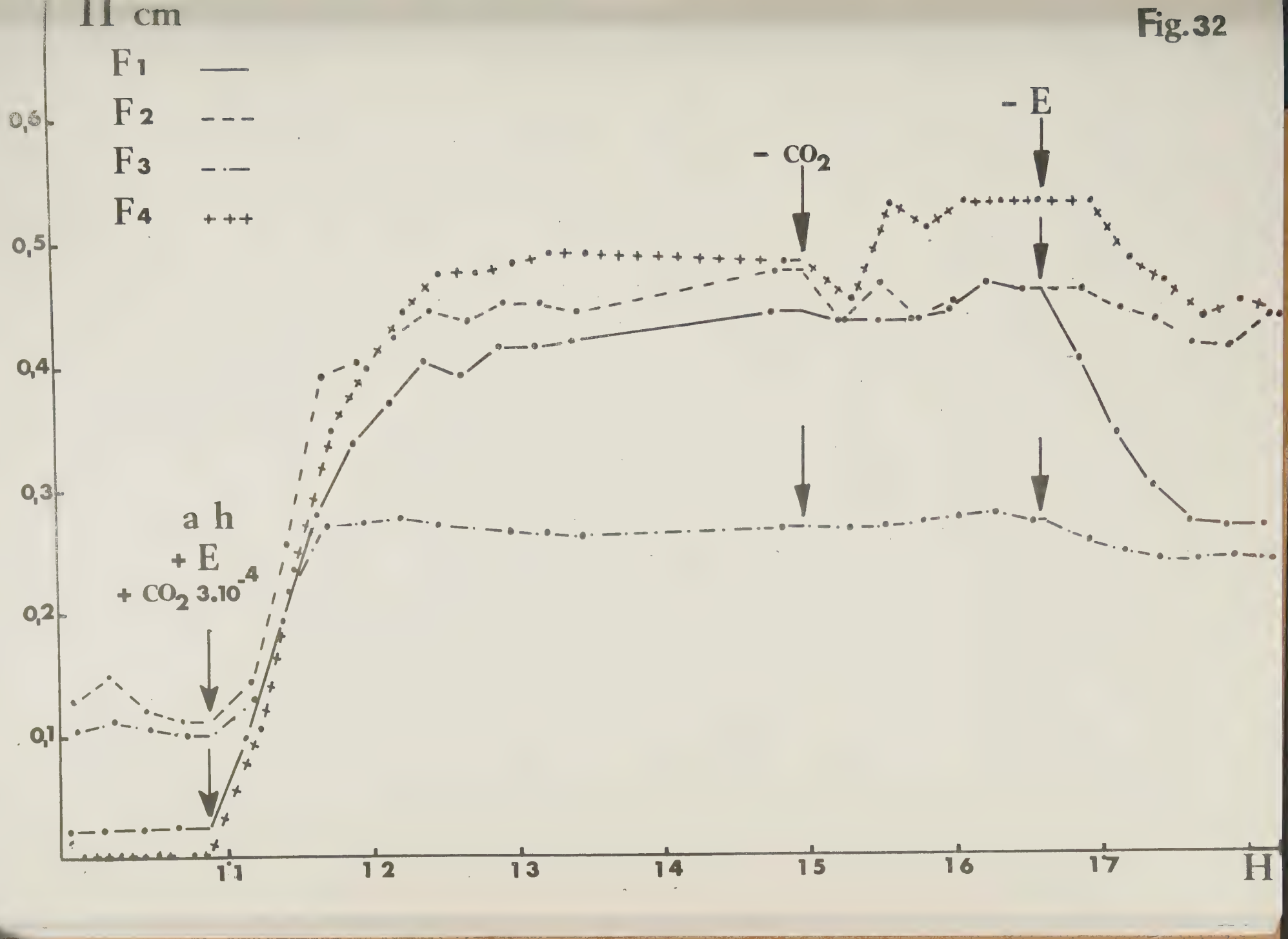


Fig. 32


11 cm
F1
F2
F3
F4
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
a h
+ E
+ CO2 3.10-4
- CO2
- E
11
12
13
14
15
16
17
H

saturation. En ce qui concerne les effets de l'air sec comparé à l'air humidifié, HEATH (1950) et WILLIAMS (1950) montrent que les vitesses d'ouverture à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique ou à la lumière ainsi que les vitesses de fermeture sont largement augmentées en air sec par rapport à l'air humide. MEIDNER et MANSFIELD (1968) signalent que tout déficit hydrique, quelle qu'en soit l'origine, s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité du mouvement des stomates aux variations de la teneur en gaz carbonique. Il est donc important d'examiner les effets comparés de l'air sec et humidifié dans nos conditions expérimentales et sur notre matériel.

3-1. Influence de l'air humide sur le degré d'ouverture des stomates.

31-1. Conditions de l'expérimentation.

Nous avons comparé les courbes d'ouverture et de fermeture des stomates des mêmes feuilles en air sec et en air saturé en vapeur d'eau. La courbe décrite fig. 31 est immédiatement comparable à la fig. 18, celle de la figure 32 doit être comparée à celle de la fig. 25. Ces quatre expériences ont été conduites successivement pendant 4 jours : le 1er jour fig. 18, le 2ème jour fig.31, le 3ème fig. 25, le 4ème fig. 32.

31-2. Résultats.

L'examen des courbes de la fig. 31 montre que le degré d'ouverture maximal est obtenu plus lentement en air humide et qu'il n'y a pas de passage net par un maximum d'ouverture puis une fermeture limitée,comme en air sec (fig. 18). On remarque également que le maximum d'ouverture semble se maintenir plus facilement en air humide qu'en air sec à l'obscurité et en l'absence de gaz carbonique. La fermeture est obtenue en air humide comme en air sec. Il ne semble pas y avoir de modification significative dans le degré d'ouverture maximal à l'exception de F_4 qui présente par ailleurs en air sec un temps de latence particulièrement important.

L'ouverture obtenue à la lumière, en air humide et en présence de gaz carbonique fig. 32 ne présente pas non plus pour le degré d'ouverture maximal, de différence importante avec celle obtenue en air sec fig. 25. Si l'on réalise un nombre suffisant d'expériences on peut calculer les moyennes des maximums d'ouverture absolus en air sec et en air humide. On obtient les résultats suivants :

	air sec	air humide
. Obscurité - CO_2	0,48 cm	0,50 cm
. Lumière + CO_2	0,39 cm	0,34 cm
. Lumière - CO_2	0,39 cm	0,41 cm

3-2. Influence de l'air humide sur les vitesses d'ouverture et de fermeture des stomates.

L'examen des courbes précédentes semble montrer une diminution très nette à la fois des vitesses d'ouverture et de fermeture en air humide. Toutefois afin d'essayer de réduire les effets de la variabilité des vitesses du mouvement des stomates, nous avons procédé à un certain nombre d'expériences, et pour chaque feuille nous avons calculé le rapport de la vitesse d'ouverture en air sec sur la vitesse d'ouverture en air humide, et fait la même chose pour les vitesses de fermeture. Les résultats sont les suivants :

- moyenne des rapports des vitesses d'ouverture : air sec sur air humide

Conditions de l'ouverture	. à l'obscurité et sans CO_2	:	1,23
	. à la lumière avec du $CO_2(3.10^{-4})$	:	1,43

- moyenne des rapports des vitesses de fermeture : 2,2

3-3. Interprétation et discussion.

Nous retrouvons sur notre matériel les données classiques concernant l'augmentation de la sensibilité au gaz carbonique des stomates dans des atmosphères sèches : l'air sec augmente notablement la vitesse d'ouverture et de fermeture des stomates. Remarquons que la moyenne des rapports des vitesses d'ouverture en air sec et air humide de l'ordre de 1,2, paraît inférieure à celle des rapports des vitesses de fermeture 2,2. Nous reviendrons ultérieurement sur cette différence pour expliquer ce phénomène, aucune des hypothèses avancées n'est satisfaisante HEATH (1959) , MEIDNER et MANSFIELD (1968). Le résultat le plus important est qu'il semble apparaître une relation entre les effets du gaz carbonique sur les vitesses du mouvement des stomates et les effets liés aux échanges d'eau de la plante. Cette notion très intéressante trouvera un nouveau support dans les expériences décrites ultérieurement.

Nous voulons nous attacher essentiellement au rôle du gaz carbonique à l'obscurité. Il apparaît donc souhaitable de se placer dans les conditions d'une sensibilité maximale des stomates aux variations de la teneur en gaz carbonique c'est-à-dire en air sec. On pourrait craindre que l'utilisation de l'air sec risque d'entraîner pour les fortes ouvertures stomatiques un déficit hydrique au niveau de la feuille, ce qui se traduirait par une fermeture des stomates. Or il n'en est rien : les maximums d'ouverture ne sont pas significativement modifiés en air sec et en air humide qu'ils soient obtenus à la lumière ou à l'obscurité. Il ne faut pas oublier cependant que si l'air sec est fourni à l'entrée de chaque poromètre, il s'est chargé, notamment aux fortes ouvertures stomatiques, de vapeur d'eau par suite de la transpiration foliaire. Nous avons vérifié que l'air effluent à 20°C peut atteindre une humidité relative de 30 à 40%. Dans ces conditions et en règle générale nous avons utilisé l'air sec, ce qui en outre permet d'uniformiser de manière simple les conditions des diverses expériences.

Le *Pelargonium X hortorum* constitue un matériel de choix, sa capacité d'absorption et de rejet de l'eau est très importante. Notre observation confirme d'ailleurs sur ce même matériel celle de MOURAVIEFF (1951).

4- EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LES VITESSES D'OUVERTURE ET DE FERMETURE DES STOMATES.

Les effets de la température sur les mouvements des stomates ont été examinés par un nombre restreint d'auteurs. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus par LOTFIELD (1921), STÅLFELT (1928), WILSON (1948), HEATH et ORCHARD (1957), HEATH et MEIDNER (1957), MEIDNER et HEATH (1959), KUIPER (1961), STÅLFELT (1962), WALKER et ZELITCH (1963), ZELITCH (1963). Un travail récent de RASCHKE (1970) conduit en même temps que nos recherches, constitue une source de comparaisons et de discussions intéressantes. De nombreuses divergences apparaissent dans les conclusions de ces auteurs. Elles peuvent en partie être expliquées par un contrôle insuffisant des conditions de l'expérimentation : ainsi, STÅLFELT(1962) indique que la vitesse d'ouverture stomatique "photoactive" peut se trouver modifiée sous l'effet des mécanismes "hydroactifs et hydropassifs". Afin d'y remédier, l'auteur prélève un fragment de feuille qu'il immerge dans l'eau ; on peut se demander par conséquent si les résultats obtenus par cette méthode sont immédiatement applicables lorsque le mouvement des stomates s'effectue dans le milieu aérien. Une autre source de difficultés tient à la variabilité des réponses des stomates. Celle-ci se rencontre non seulement entre des espèces ou des individus différents mais aussi pour les mêmes stomates d'un même individu.

Si les auteurs s'accordent généralement pour conclure à une influence de la température sur la vitesse d'ouverture stomatique, il ressort de leurs conclusions que le mouvement de fermeture est au contraire peu affecté. Nous avons donc entrepris une étude systématique du rôle de la température sur les vitesses d'ouverture et de fermeture des stomates de *Pelargonium X hortorum*, l'ouverture étant provoquée par le passage de l'air de teneur en gaz carbonique 0,03% à 0% à l'obscurité, la fermeture par l'opération inverse.

4-1. Conditions d'étude du rôle de la température.

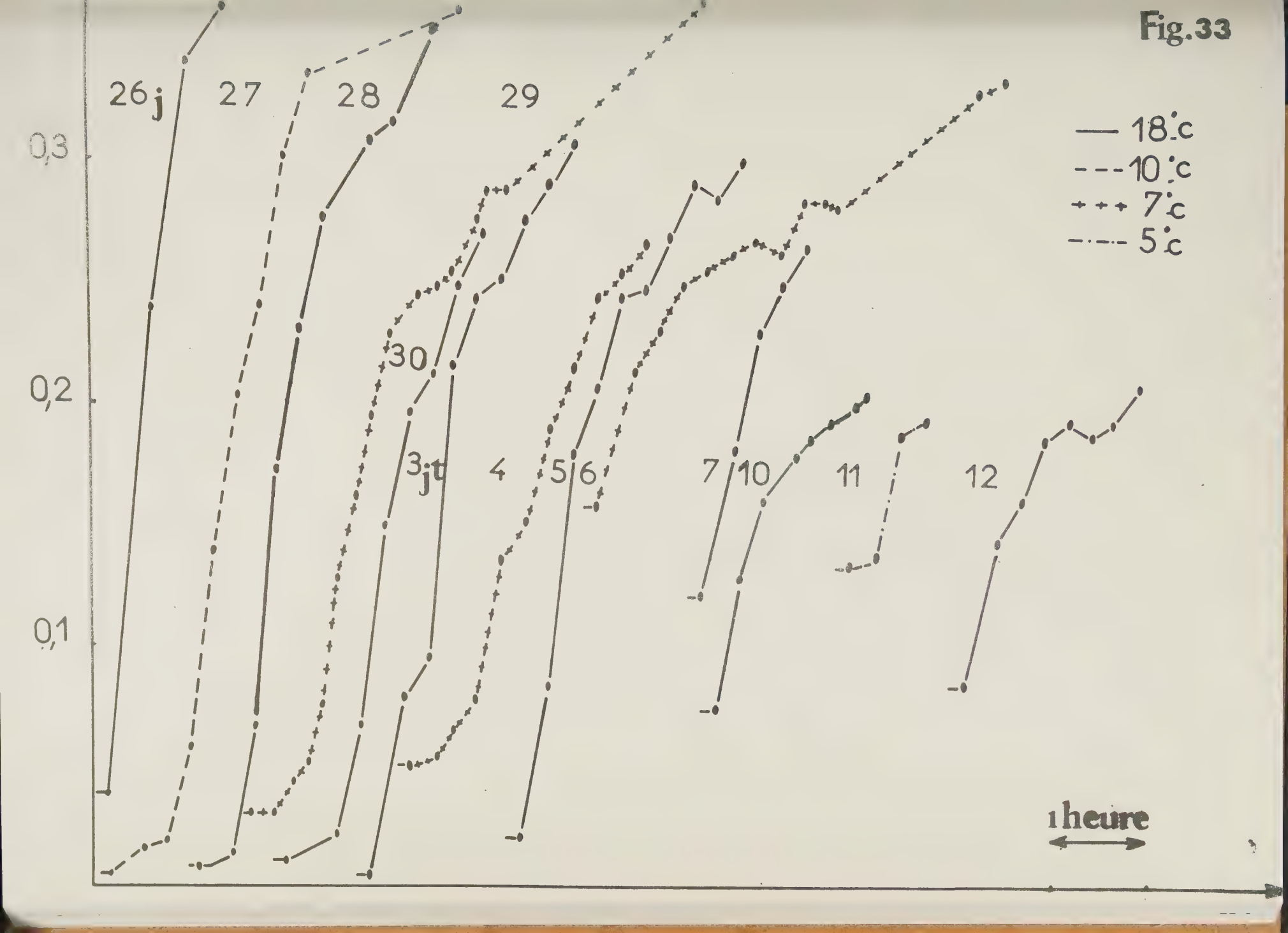
41-1. Conditions expérimentales.

Les conditions générales sont conservées. Les expériences se déroulent dans une chambre isotherme, toute la plante est maintenue à la même température que celle des stomates de la feuille expérimentée. Comme précédemment, la vitesse sera en général exprimée par l'augmentation de Π une heure après l'application du traitement d'ouverture ($\Delta\Pi_1$) ou par sa diminution ($-\Delta\Pi_1$) après l'application du traitement de fermeture. Toutefois, des vitesses particulièrement grandes nous obligent parfois à mesurer l'accroissement ou la diminution de Π après une demi heure ($\pm \Delta\Pi\ ^1/_2$). Pour les comparaisons on ramène les mesures à $\pm \Delta\Pi_1$

Fig. 33. Courbes représentatives des ouvertures stomatiques d'une même feuille en fonction du temps pour des dates successives et des températures variables. J = Juin Jt = Juillet.

Fig. 34. Courbes représentatives des fermetures stomatiques de la feuille précédente en fonction du temps pour les mêmes dates et les mêmes températures.

Fig.33



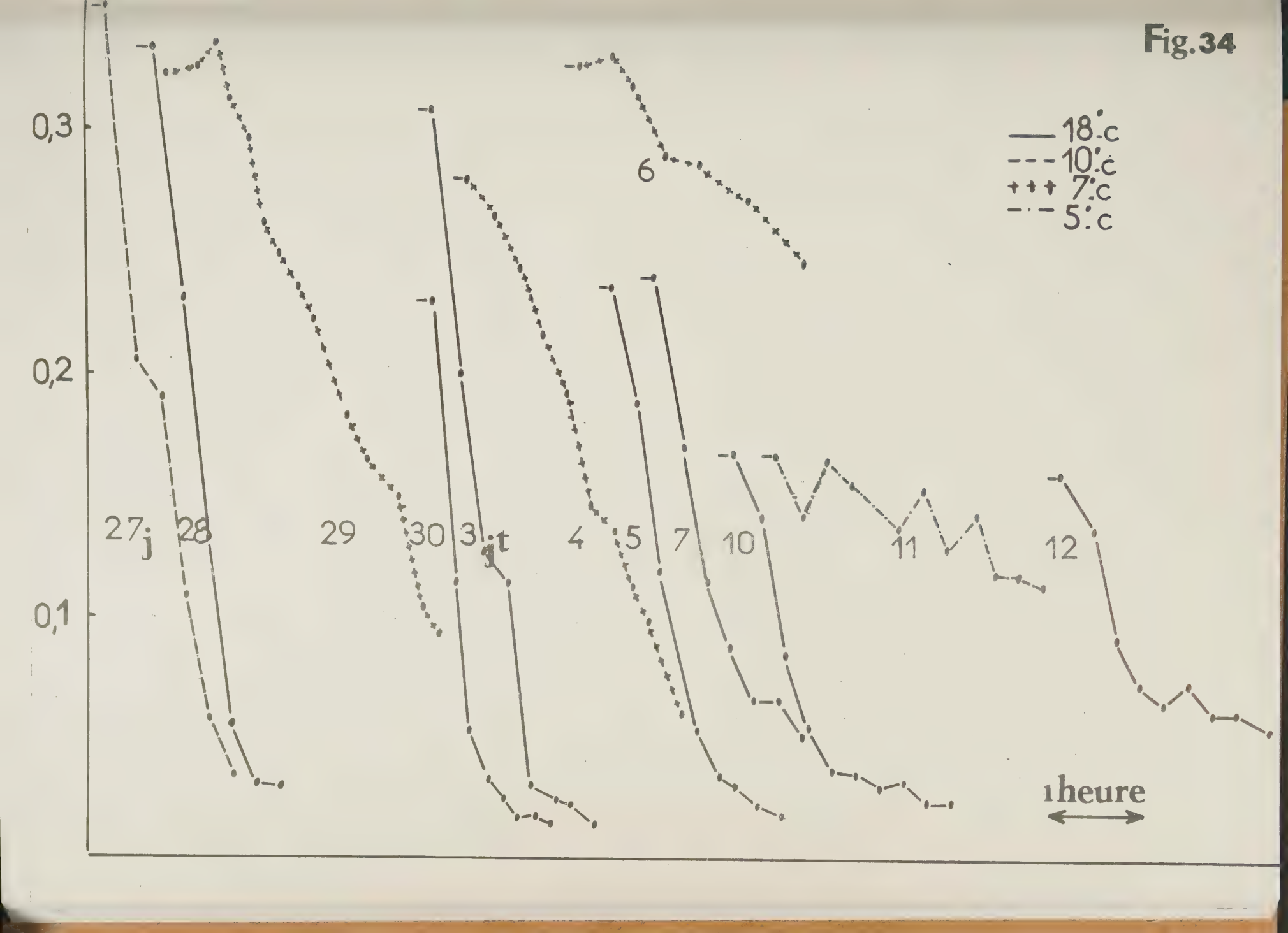


Fig.34
0,3
0,2
0,1
18°c
10°c
7°c
5°c
6
27j
28
29
30
31
1
4
5
7
10
11
12
1heure

41-2. Mise en évidence des conditions liées au matériel végétal préalable à l'étude du rôle de la température.

Afin d'illustrer les problèmes principaux, nous avons retenu une expérience portant sur une feuille, qui s'est déroulée du 25 juin au 13 juillet, date de la mort de la feuille expérimentée.

L'étude des effets de la température sur la vitesse du mouvement des stomates sera effectuée sur un seul individu pour éviter les variations entre individus.

412-1. Conditions expérimentales.

La feuille en expérience, maintenue sur pied, est laissée en permanence dans la chambre porométrique pendant toute la durée de l'expérimentation. Sa longévité ayant été particulièrement grande-nous avons pu réaliser plusieurs mesures, soit à la même température (20°C), soit à d'autres températures. Quelle que soit la température, les plantes sont remises à la température de 20°C lorsqu'on fournit pendant la nuit l'éclairement nécessaire pour la nutrition de la plante.

412-2. Résultats.

Les résultats sont consignés dans le tableau IV et illustrés par les figures 33 et 34.

4122-1. Examen des figures.

Sur la figure 33 nous avons porté les courbes représentatives de l'ouverture des stomates depuis l'application du traitement jusqu'à l'obtention du degré d'ouverture maximum. Les courbes sont décalées latéralement pour éviter tout chevauchement. Elles correspondent aux mesures effectuées les 26, 27, 28, 29, 30 Juin et 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 Juillet. L'heure d'application du traitement d'ouverture est comprise entre 10h et 10h30 à l'exception du 26 Juin où elle se situe à 14h.

Sur la figure 34, les courbes représentatives de la fermeture des stomates correspondent au 27, 28, 29, 30 Juin et 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 et 12 Juillet.

4122-2. Examen du tableau de résultats.

L'ensemble des modes de mesure de la vitesse est porté pour chaque expérience. Nous avons ajouté également les degrés d'ouverture stomatique au moment de l'application du traitement d'ouverture et la valeur du maximum atteint. Nous avons regroupé les résultats des mesures réalisées à 20°C qui sont les plus nombreuses. Afin de rendre comparables les divers critères, *nous avons choisi comme référence les mesures effectuées le 28 Juin à 20°C ;* toutes les autres mesures seront exprimées en pourcentages de ces valeurs.

- Comparaison des degrés d'ouverture au moment de l'application

Tableau IV. Variation des vitesses d'ouverture et de fermeture pour une fe
en fonction du temps et de la température.

Π_D = degré d'ouverture des stomates à l'obscurité au mo
de l'application du traitement.

Π_M = degré d'ouverture maximal.

$\Delta\Pi_1$ = accroissement de Π pendant la première heure de t
tement.

$\Delta\Pi_1/_2$ = accroissement de Π pendant la 2è 1/2 heure de tr
ment.

$-\Delta\Pi_1$ = diminution de Π pendant la 1ère heure de traiteme

$-\Delta\Pi_1/_2$ = diminution de Π pendant la 1ère 1/2 heure de trai
ment.

J = Juin

Jt = Juillet

28 Juin : les chiffres soulignés servent de référence pour
culer les pourcentages.

Groupe	Température	Date	Ouverture initiale	Maximum		Vitesse d'ouverture				Vitesse de fermeture			
			Π_D	Π_M	Π_M %	$\Delta\Pi_1$	$\Delta\Pi_1$ %	$\Delta\Pi_{1/2}$	$\Delta\Pi_{1/2}$%	$-\Delta\Pi_1$	$-\Delta\Pi_1$%	$-\Delta\Pi_{1/2}$	$-\Delta\Pi_{1/2}$%
1er Groupe	20°C	26 J	0.029	0.405	115	0.356	160	0.049	33	-	-	-	-
		28 J	0.008	0.354	100	0.222	100	0.164	100	0.302	100	0.200	100
		30 J	0.010	0.270	77	0.202	91	0.145	89	0.190	63	0.176	88
		3 Jt	0.020	0.307	88	0.222	100	0.147	90	0.276	90	0.178	89
		5 Jt	0.025	0.307	88	0.219	98	0.081	50	0.193	65	0.117	58
2ème Groupe	20°C	7 Jt	0.121	0.276	78	0.144	65	0.035	21	0.183	60	0.135	67
		10 Jt	0.073	0.202	57	0.111	50	0.024	15	0.130	43	0.083	41
		12 Jt	0.082	0.204	58	0.108	49	0.032	20	0.094	31	0.068	34
1er Groupe	10°C	27 J	0.005	0.362	102	0.140	63	0.126	77	0.292	97	0.160	80
	7°C	29 J	0.030	0.366	103	0.132	60	0.087	53	0.061	20	-	-
	7°C	4 Jt	0.050	0.280	80	0.096	43	0.070	43	0.084	28	0.036	18
2ème Groupe	9°C	6 Jt	0.178	0.332	94	0.072	32	0.028	17	0.036	11	0.007	5
	5°C	11 Jt	0.132	0.193	55	0.055	25	0.001	1	0.018	6	0.002	1

TABLEAU IV : Variations des vitesses d'ouverture et de fermeture pour une feuille en fonction du temps et de la température.

du traitement (Π_D), quelle que soit la température.

Bien que les feuilles soient maintenues à l'obscurité on n'observe pas de fermeture complète ($\Pi_D = 0$). Cette constatation peut être généralisée ; les stomates de *Pelargonium X hortorum* ne sont que rarement entièrement fermés.

On peut distinguer deux groupes de valeurs le premier concernant les mesures effectuées jusqu'au 5 juillet inclus, pour lequel les valeurs de Π_D ne dépassent pas 0,05, le second comprenant des valeurs de Π_D plus élevées qui atteignent même 0,178 le 6 juillet. *On constate donc qu'à partir du 6 juillet les stomates ne peuvent plus se fermer à l'obscurité.*

- Comparaison des maximums d'ouverture (Π_M) quelle que soit la température.

On exprime le maximum d'ouverture en pourcentage de l'ouverture maximale obtenue le 28 Juin. *On constate que l'écart des pourcentages de* Π_M(% Π_M) *avec 100%* ne dépasse pas 20% jusqu'au 7 juillet inclus ; au-delà, les pourcentages s'en *écartent sensiblement (57, 58, 55 %)*. Il faut remarquer que le *degré d'ouverture maximal obtenu ne dépend pas significativement de la température*, ce qui confirme les premières observations de KUIPER (1961) et de STALFELT (1962). Cependant cette observation n'est valable que pour la gamme de températures considérées de 0°C jusqu'à 20°C.

- Comparaison des vitesses à 20°C ($\Delta\Pi$).

Pendant la durée de l'expérience nous avons répété 8 fois les mesures à 20°C.

⊕ - Vitesse d'ouverture.

Considérons la colonne des pourcentages de $\Delta\Pi_1$ (tableau IV). Nous constatons les 28, 30 juin et les 3 et 5 juillet les valeurs de 100, 91, 100, 98 %. Ces valeurs sont remarquablement proches, et nous observons qu'elles correspondent au premier groupe de mesures déjà signalé plus haut. Le 26 juin fait exception (160 % mais nous avons déjà précisé que le traitement a été appliqué à 14h au lieu de 10h30 pour les autres mesures. A partir du 7 juillet les pourcentages s'écartent sensiblement de 100 : 65, 50, 49 ; l'écart observé semble donc lié à l'ouverture anormale qui caractérise le second groupe de mesures.

⊕ - Vitesse de fermeture.

Celles-ci varient plus que les vitesses d'ouverture. Cependant les pourcentages de $-\Delta\Pi_1/2$ semblent moins fluctuer que ceux de $-\Delta\Pi_1$ pour le premier groupe de mesures. Elles sont encore plus modifiées dans le second groupe.

- Comparaison des vitesses aux autres températures.

Si nous éliminons les mesures du 2ème groupe puisqu'à 20°C nous observons des phénomènes anormaux, nous pouvons constater le 29 juin et

le 4 juillet à 7°C et le 27 juin à 10°C des écarts sensibles qui nous permettent d'entrevoir l'influence de la température sur les vitesses des mouvements stomatiques.

412-3. Discussion.

4123-1. Conditions de l'expérimentation.

Celles-ci doivent être rigoureusement définies. Lorsque les plants de Pelargonium sont transférés dans l'enceinte expérimentale avec inversion des périodes d'éclairement, il faut respecter un délai d'au moins deux jours avant le début de l'expérimentation pour que l'adaptation de la plante à ces nouvelles conditions soit réalisée. Si les plants étaient initialement éclairés en lumière naturelle solaire, un séjour d'au moins quinze jours en régime artificiel est nécessaire. L'accroissement anormal de la vitesse d'ouverture (160%) observée le 26 juin montre que l'heure d'application du traitement d'ouverture doit être le même pour toutes les expériences (en pratique entre 9h30 et 10h). D'autre part les expériences ne peuvent être poursuivies sur une même feuille que si son comportement reste normal. Ainsi les stomates doivent être peu ouverts à l'obscurité avant l'application du traitement d'ouverture ($\Pi_D < 0,05$). Il est d'ailleurs remarquable de constater que des symptômes défavorables sont observés pour la première fois le 6 juillet ; en second lieu apparaît l'inaptitude des stomates à atteindre le maximum d'ouverture possible et en dernier lieu seulement le jaunissement de la feuille (le 12 juillet) précédant la mort de la feuille. Le caractère général de cette observation nous permet d'affirmer que chez le *Pelargonium X hortorum au moins, l'altération du mouvement des stomates est le signe précurseur du vieillissement foliaire naturel ou artificiel et qu'il précède les premiers symptômes apparents de la dégradation de la chlorophylle d'une semaine environ.*

Toute feuille qui ne satisfait pas à l'ensemble de ces conditions doit être rejetée.

4123-2. Etude de la variabilité.

La variabilité observée déjà entre les vitesses des mouvements stomatiques pour une même feuille en bon état physiologique conduit donc à penser que les comparaisons nécessaires avec d'autres feuilles provenant d'individus différents seront très difficile à interprêter. Ceci explique à notre sens le nombre relativement restreint de publications sur ce sujet ainsi que les contradictions importantes qu'elles révèlent. Si l'on ajoute à cela les critiques développées par STÅLFELT(1962) et si l'on se souvient que l'examen microscopique d'un lambeau d'épiderme révèle des écarts importants entre le degré d'ouverture de stomates adjacents, ASHBY (1931), on comprend que la variabilité des mesures puisse conduire à des conclusions hâtives si un trop petit nombre de mesures est réalisé. ASHBY estime que la distribution des largeurs d'ouverture ne suit pas une loi normale. Nous avons cependant entrepris une étude systématique du rôle de la température en respectant les conditions normalisées décrites ci-dessus.

4-2. Influence des températures moyennes : 20°C, 10°C, 6°C sur les vitesses du mouvement des stomates.

Les premiers résultats obtenus pour la feuille examinée dans l'expérience préliminaire semblent suggérer une influence très particulière de la température notamment sur la vitesse de fermeture à 6°C qui est particulièrement réduite. Nous avons pensé qu'une étude statistique pouvait nous permettre d'apprécier quantitativement l'incertitude sur nos résultats.

42-1. Objectifs d'une étude statistique.

Comme nous l'avons signalé précédemment, à l'examen microscopique les ouvertures stomatiques d'une même feuille ne paraîssent pas suivre une loi normale. Toutefois, ceci ne prouve pas,à priori, que les vitesses des mouvements d'un grand nombre de stomates (plusieurs milliers) effectivement appréciées par la mesure porométrique ne suivent pas une loi normale.

Une des causes de la variabilité des résultats est liée à l'hétérogénéité du matériel biologique notamment en ce qui concerne le développement des plantes. Celui-ci s'effectue au long de l'année et cette hétérogénéité se traduit par une morphologie externe variable (taille et nombre de feuilles). D'autre part, les feuilles testées ne peuvent pas être toutes prises au même âge physiologique pour des raisons pratiques évidentes. Il est donc impossible, à priori, de contrôler ces conditions, et sachant l'influence des modalités du développement sur le mouvement des stomates grâce aux expériences préliminaires, il pouvait paraître assez hasardeux d'entreprendre une étude statistique.

42-2. Comparaison des vitesses d'ouverture à 20°C, 10°C, et 6°C.

La nécessité d'effectuer un grand nombre de mesures pour différentes températures pose le problème de la durée de l'expérimentation. Celle-ci ne peut-être allongée indéfiniment à notre sens. Nous avons choisi quelques températures particulièrement intéressantes pour l'étude statistique et nous avons réalisé un nombre plus restreint de mesures aux autres températures.

Dans un premier temps nous avons vérifié que la distribution des vitesses d'ouverture ($\Delta\Pi_1$) à 20°C suivait une loi normale. L'application du test χ^2 (HELLER 1968) permet de vérifier que l'hypothèse de la normalité de la distribution n'est pas contredite par le test.

La moyenne des $\Delta\Pi_1$ ($\overline{\Delta\Pi_1}$) à 20°C est de 0,316 cm heure $^{-1}$. Si l'on exprime les vitesses d'ouverture à 20°C, 10°C et 6°C en pourcentages de $\overline{\Delta\Pi_1}$ (20°C) on obtient en calculant les intervalles de confiance pour p = 0,05 les résultats suivants.

Pourcentages de $\overline{\Delta\Pi_1}$ et intervalles de confiance de la moyenne à p=0,05

Températures	20°C	83,5	<	100	<	116
	10°C	41	<	58	<	75
	6°C	43	<	68	<	83

On constate que les limites des intervalles de confiance ne se recouvrent pas entre t = 20°C et t= 10°C, ou t= 20°C et t= 6°C.

Les différences sont significatives.

Par contre entre t= 10°C et t= 6°C les intervalles se chevauchent. L'application du test t de STUDENT entre ces deux températures montre que ces différences ne sont pas significatives. Une notion fréquemment utilisée par les biologistes est celle de Q_{10}. Celui-ci calculé à partir des moyennes à 20°C et 10°C est égal à :

$$\frac{100}{58} = 1,72.$$

Le Q_{10} est le rapport de deux variables (vitesses d'ouverture à 20°C et à 10°C) qui suivent chacune une loi normale. A condition que ces variables soient indépendantes ce que semble indiquer les résultats expérimentaux, on peut déterminer la valeur minimum de l'intervalle de confiance de ce rapport (voir Annexe). Le calcul donne comme intervalle de confiance au seuil 0,05 : $1,4 < Q_{10} < 2,1$

42-3. Comparaison des vitesses de fermeture à 20°C, 10°C et 6°C.

Après avoir vérifié également que l'hypothèse de la normalité de la distribution à 20°C n'était pas contredite par les tests, nous avons exprimé les résultats en pourcentage de la moyenne des diminutions de après une 1/2 heure de traitement ($-\overline{\Delta\Pi_{1/2}}$).

A 20°C $-\overline{\Delta\Pi_{1/2}}$ = 0,293 cm

Pourcentages de $\Delta\Pi_{1/2}$ et intervalles de confiance de la moyenne à p= 0,05.

Températures	20°C	82	<	100	<	117
	10°C	49	<	73	<	97
	6°C	21	<	30	<	39

Les intervalles de confiance se recoupent entre 20°C et 10°C mais les différences sont significatives entre 20°C et 6°C, 10°C et 6°C.

Si nous comparons les vitesses à 20°C et 10°C, le test F de SNEDECOR permet de montrer que F = 2,15 ; or F0,05 = 2,3 et F0,01 = 3,3 pour $\nu_1 = 9$ et $\nu_2 = 26$, donc on peut appliquer le test de STUDENT. On trouve que :

td = 1,61 or pour $\nu = 40$, t0,05 = 2,02 et t0,01 = 2,72.

La différence n'est donc pas significative. Par contre la comparaison des vitesses entre 20°C et 6°C, 10°C et 6°C par l'application de ce même test permet de montrer que les différences sont hautement significatives.

Conclusions. *Il est tout à fait remarquable de constater que les vitesses d'ouverture à 10°C et 6°C ne sont pas significativement différentes alors que les vitesses de fermeture présentent des différences hautement significatives.* Afin de préciser ces résultats nous avons étudié les variations du rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture établi pour chaque feuille à chaque température.

42-4. Influence comparée des températures 20°C et 6°C sur le rapport :

$$R = \frac{\text{vitesse d'ouverture}}{\text{vitesse de fermeture}}$$

Θ 20°C $\quad \overline{R} = 0,92$

Pour p = 0,05 les limites des intervalles de confiance de la moyenne sont :

$$0,82 < 0,92 < 1,02$$

Θ 6°C $\quad \overline{R} = 2,1$

Pour p = 0,05 les limites des intervalles de confiance sont :

$$1,45 < 2,1 < 2,75$$

La différence est donc significative.

4-3. Influence de températures plus basses et plus élevées.

43-1. Influence des basses températures.

431-1. Températures inférieures à 6°C.

Lorsque la température s'abaisse, le rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture croît très rapidement : à 4°C, la moyenne des

Fig. 35. Courbes représentatives du mouvement des stomates à 4°C.

Fig. 36. Mesure de la perméabilité de la feuille aux gaz lorsque la température est abaissée progressivement jusqu'à la température de congélation.

Tableau V. Etude comparée des vitesses du mouvement des stomates ($\Delta\Pi_1/_2$ et $-\Delta\Pi_1/_2$), du degré d'ouverture maximal (Π_M) et du rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture ($\Delta\Pi_1/_2$ / $-\Delta\Pi_1/_2$) pour les températures 20°C, 30°C, 35°C et 38°C.

Légende voir tableau IV.

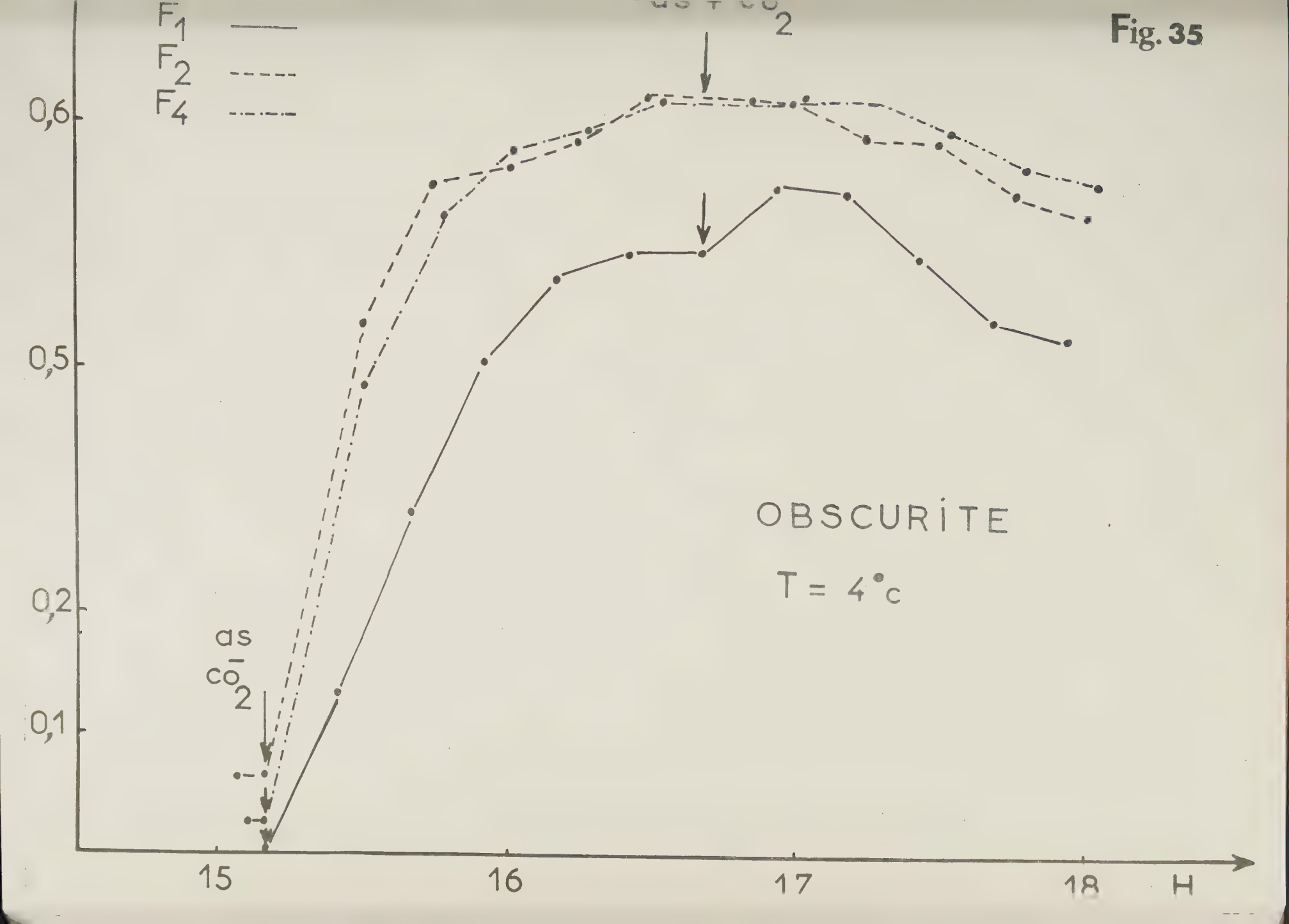
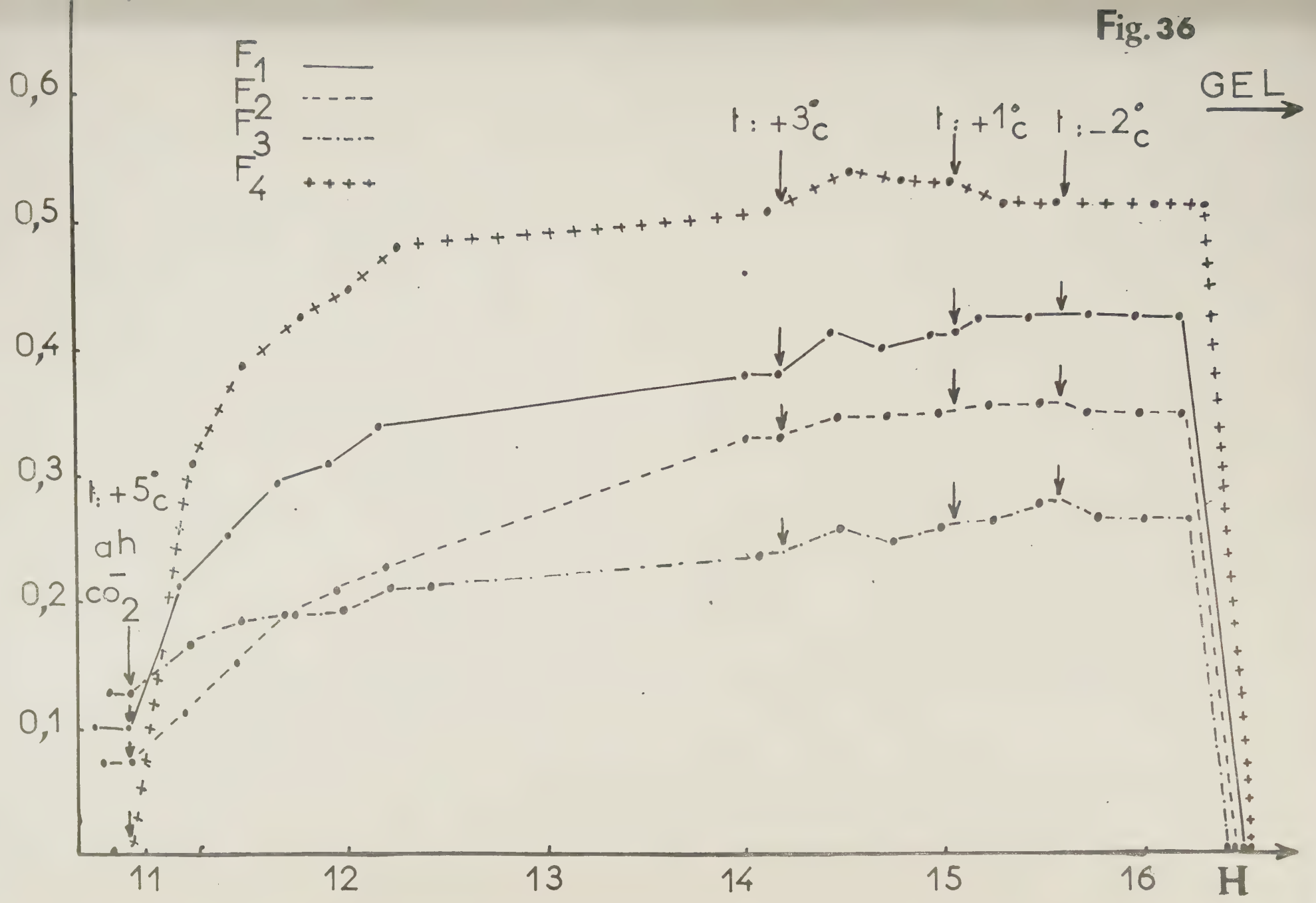


Fig. 35

Fig. 36


F1
F2
F3
F4
GEL
t : +3°C
t : +1°C
t : −2°C
t : +5°C
ah
CO2
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
11
12
13
14
15
16
H

Vitesses	$\Delta \Pi \frac{1}{2}$				$-\Delta \Pi \frac{1}{2}$				Π_M				$\Delta\Pi \frac{1}{2} / -\Delta\Pi \frac{1}{2}$			
t°C	20	30	35	38	20	30	35	38	20	30	35	38	20	30	35	38
F_1	0,380	0,385	0,540	0,950	0,385	1,08	1,34	1,35	0,480	0,445	0,350	0,400	0,96	0,36	0,40	0,71
F_2	0,300	0,480	0,700	1,30	0,385	1,0	1,87	1,95	0,525	0,515	0,515	0,520	0,78	0,48	0,39	0,66

TABLEAU V : Etude comparée des vitesses du mouvement des stomates ($\Delta\Pi \frac{1}{2}$ et $-\Delta\Pi \frac{1}{2}$), du degré d'ouverture maximal (Π_M) et du rapport vitesse d'ouverture / vitesse de fermeture ($\Delta\Pi \frac{1}{2} / -\Delta\Pi \frac{1}{2}$) pour les températures 20°C, 30°C, 35°C, et 38°C.

Légende : voir tableau IV.

valeurs du rapport est de 4,7 et il croît jusqu'à la température limite qui entraîne la cristallisation de l'eau. Les stomates sont dans l'incapacité de se fermer (fig. 35)

431-2. Température de congélation.

Lorsque la température s'abaisse progressivement et que la glace se forme on *constate une chute brutale* de la perméabilité de la feuille aux gaz circulant par diffusion libre (fig. 36). L'interprétation de ce phénomène découle des expériences réalisées sur la pomme par Mme LE SAINT (1957). L'auteur constate le même phénomène et l'explique par la formation de cristaux de glace dans les méats au cours de la première phase de gel qui entraîne l'obstruction très rapide des espaces intercellulaires, ce qui explique la valeur de $\Pi = 0$ obtenue dans ces conditions.

43-2. Effets des températures élevées 30°C, 35°C et 38°C sur le mouvement des stomates.

L'étude statistique n'a pas été réalisée pour ces températures.

432-1. Premier cas : le maximum d'ouverture n'est pas affecté par l'élévation de la température.

Parmi les expériences réalisées nous avons extrait les mesures correspondant à deux feuilles particulièrement représentatives. Les traitements d'ouverture et de fermeture ont été appliqués dans les conditions déjà décrites pour les températures 20°C, 30°C, 35°C et 38°C. Les vitesses deviennent très grandes et la variation $\Delta\Pi$ est mesurée soit 15, 10 ou 5 minutes après l'application du traitement. Afin de rendre les vitesses comparables, ces valeurs sont ramenées à une demi-heure, c'est-à-dire $\Delta\Pi_{1/2}$ pour l'ouverture ou $-\Delta\Pi_{1/2}$ pour la fermeture. On détermine également l'ouverture maximale Π_M et le rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture. Ces résultats sont consignés dans le tableau V. L'ouverture maximale est peu affectée par l'augmentation de la température par contre les vitesses croissent. Le rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture voisin de 1 pour F_1 et de 0,8 pour F_2 à 20°C, s'abaisse à 30°C et 35°C. Il semble remonter légèrement à 38°C. Étant donné la variabilité observée il est préférable de ne pas donner de valeur de Q_{10}.

432-2. Second cas : le maximum d'ouverture est affecté.

Dans une série d'expériences nous avons observé à 30°C et en air sec l'inaptitude des stomates à s'ouvrir à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique, les plantes proviennent de la serre et sont soumises aux expériences deux jours après. Dans l'expérience décrite fig. 37, les mêmes feuilles sont à nouveau expérimentées une dizaine de jours après. On peut constater que l'ouverture est obtenue mais qu'elle reste limitée. Le remplacement de l'air sec par de l'air humidifié (H.R. 95%) n'entraîne pas de modifications significatives, en effet, on pourrait penser que les stomates de F_3 s'ouvrent à la suite de ce traitement en air humidifié mais les stomates étant très peu ouverts le risque de déficit hydrique en

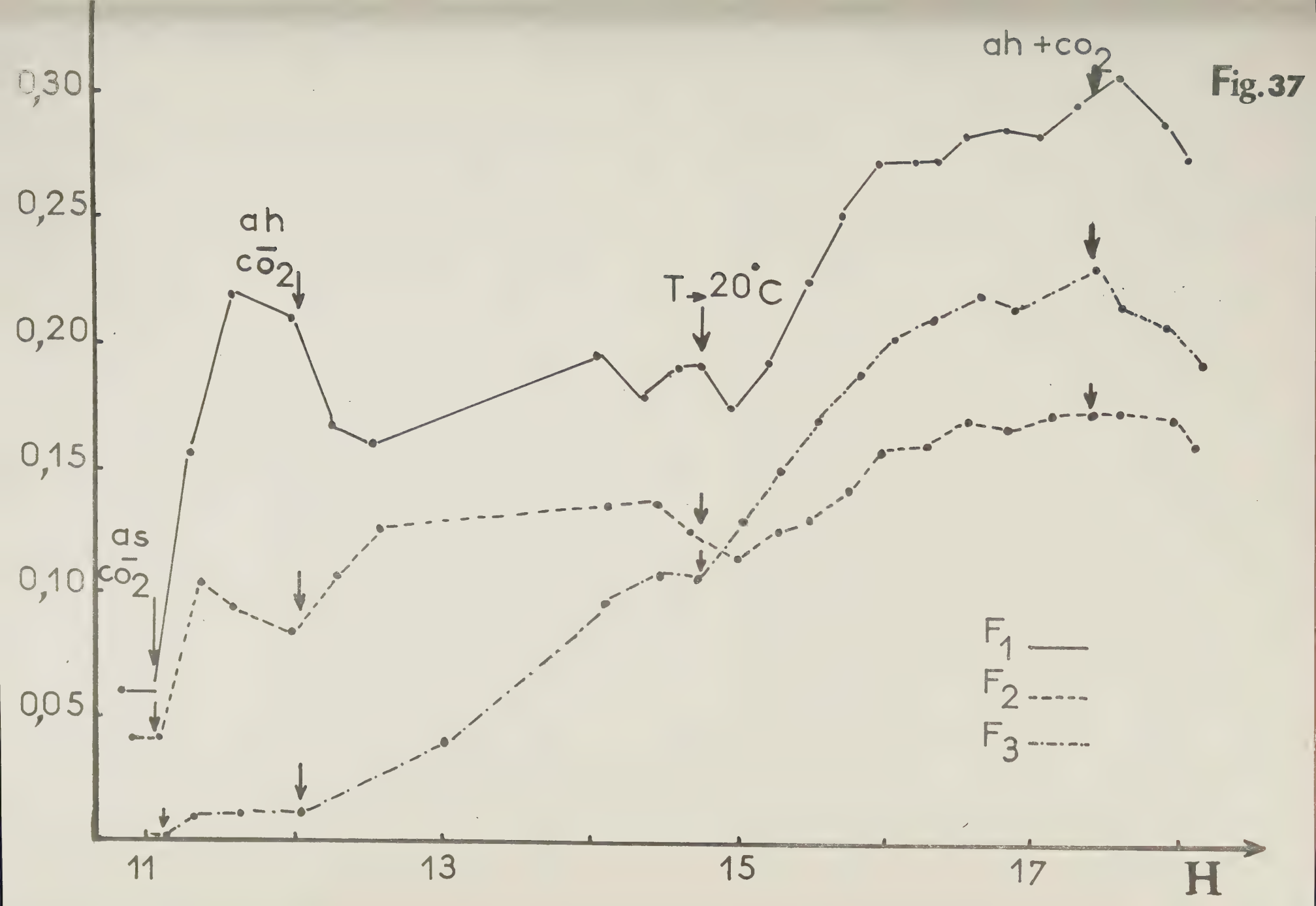

0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
ah +co2
ah
co2
T→20°C
as
co2
F1
F2
F3
11
13
15
17
H

Fig.37

air sec est quasi nul. Par contre, l'abaissement de la température de 30°C à 20°C entraîne aussitôt un surcroît d'ouverture significatif. Dans ce 2è cas, il n'est pas possible évidemment de comparer les vitesses du mouvement des stomates.

4-4. Discussion des résultats.

44-1. Validité des résultats.

441-1. Intérêt de l'analyse statistique.

La méthode fine d'étude utilisée permet d'obtenir des mesures de vitesse avec une bonne précision. La variabilité importante des résultats rend leur interprétation très délicate lorsqu'on ne recourt pas au traitement statistique des données. La variabilité des vitesses de fermeture semble supérieure à celle observée pour l'ouverture et ceci explique peut-être le manque d'information concernant l'influence de la température sur les vitesses de fermeture.

441-2. Risques d'interférences avec des facteurs hydriques.

4412-1. La transpiration.

STÅLFELT (1962) met justement en évidence les risques d'interférences entre les mécanismes "photoactifs" qu'il étudie et les mécanismes "hydroactifs ou hydropassifs". On sait que le *Pelargonium X hortorum* est de ce point de vue peu sensible au déficit hydrique. Dans la gamme des températures 0°C à 20°C nos expériences montrent que le maximum d'ouverture n'est pas affecté par la température ce qui est en faveur d'un équilibre hydrique satisfaisant. Pour des températures plus élevées telles que 30°C, le maximum d'ouverture peut ne pas être atteint. Cependant l'expérience décrite fig. 37 montre que l'air humidifié n'entraîne pas de modifications significatives du degré d'ouverture maximal par rapport à l'air sec ; par contre l'abaissement de la température joue un rôle déterminant. Il semble donc que chez le *Pelargonium X hortorum* , il s'agisse d'un phénomène lié à l'insuffisance de l'adaptation des plantes à ces conditions de température élevée. La différence entre le comportement des feuilles au début et 10 jours après le transfert dans l'enceinte expérimentale va dans le sens de cette explication.

4412-2. L'absorption de l'eau.

Les feuilles expérimentées sont soumises à la même température que le reste de la plante ce qui permet de limiter les risques de gradients thermiques. Toutefois, aux basses températures on peut craindre que l'absorption de l'eau soit sévèrement limitée et conduise ainsi à un déficit hydrique. Remarquons une nouvelle fois que les stomates atteignent leur degré d'ouverture maximal quelle que soit la température. Nous avons cependant

réalisé une série d'expériences dans lesquelles les racines des plantes étaient portées à une température supérieure (10°C environ) à celle des feuilles à l'aide d'un ruban chauffant. Les résultats indiquent que les vitesses des mouvements des stomates ne sont pas significativement modifiées.

44-2. Influence de la température sur les vitesses d'ouverture.

442-1 $T \leq 20°C$.

Nous retrouvons les faits classiques concernant les valeurs du Q_{10}. *Entre 10°C et 20°C nous obtenons une valeur voisine de 2 caractéristique des réactions chimiques des organismes vivants.*

Les écarts entre nos valeurs et celles observées dans la littérature : 2,6 pour STÅLFELT(1962) et 2,2 pour MEIDNER et HEATH (1959) ne semblent pas significatifs selon l'analyse statistique.

442-2. $T \leq 20°C$.

Aux températures élevées les vitesses d'ouverture sont grandes, l'ouverture maximale est obtenue après 10 à 15 minutes. Il semble que les stomates des plantes non adaptées ne peuvent s'ouvrir à certaines températures (30°C à 35°C) et qu'il ne s'agit pas là, du moins chez le *Pelargonium X hortorum* , d'un mécanisme de régulation hydroactif.

44-3. Influence de la température sur le rapport : vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture.

Alors que ce rapport est voisin de 1 à 20°C, il augmente de manière importante en-dessous de 7°C et au contraire il semble très nettement diminuer pour les températures de 30°C et 35°C.

La théorie classique du mouvement des stomates fait intervenir le mécanisme suivant : l'augmentation de la teneur en gaz carbonique entraîne une diminution du pH et la synthèse d'amidon ; sa diminution provoque le phénomène inverse et il apparaît des sucres osmotiquement actifs. L'intervention d'une phosphorylase semble nécessaire. Or, ce mécanisme serait réversible et contrôlé par la teneur en gaz carbonique. Dans ces conditions le rapport vitesse d'ouverture sur vitesse de fermeture ne devrait pas varier significativement, c'est ce que l'on observe effectivement au-dessus de 7°C.

Par contre, en-dessous, la vitesse de fermeture est largement inhibée. Ce fait constitue à notre sens une preuve expérimentale en faveur de l'existence de mécanismes différents pour l'ouverture et la fermeture. LEVITT (1967) se fondant sur des considérations théoriques aboutit à une conclusion analogue. Cet auteur propose l'action d'une phosphorylase, puis d'une phosphatase qui permettrait la formations de sucres, l'appel d'eau, et l'ouverture des stomates et, pour la fermeture, l'amidon serait resynthétisé sous l'action d'une glucosyl-transférase. Dans cette hypothèse, le

rôle de l'amidon est essentiel. Toutefois il est possible de supposer que les transformations de l'amidon ne seraient qu'un mécanisme secondaire lié au mécanisme principal. C'est l'opinion de WILLIAMS (1954) et plus récemment de FISCHER (1968).

44-4. Etude comparative de nos résultats et des effets de la température sur le degré d'ouverture des stomates de Zea mays à la lumière. Discussion.

RASCHKE (1970) a récemment publié une étude très complète de l'influence de la température sur le degré d'ouverture des stomates de *Zea mays* à la lumière. Il nous paraît intéressant de comparer ses principaux résultats aux nôtres. L'auteur trouve des Q_{10} de l'ordre de 1,8 à 1,6 à la lumière, très proches des nôtres (1,7) obtenus à l'obscurité. D'autre part la comparaison du degré d'ouverture des stomates et de l'assimilation nette du gaz carbonique entre 15°C et 35°C conduit cet auteur à estimer que dans cette zone de température au moins , le degré d'ouverture des stomates est largement contrôlé par la teneur en gaz carbonique des espaces intercellulaires, ce que nous ne contredirons pas. Par contre l'auteur observe au-dessus de 40°C une ouverture des stomates marquée, alors que nous observons parfois une diminution de celle-ci. Selon RASCHKE le *degré d'ouverture maximum obtenu* à l'équilibre dépend de la température, alors que dans nos expériences celui-ci semble indépendant de la température. Par contre le temps mis pour atteindre le maximum ne semble pas beaucoup dépendre de la température entre 15°C et 30°C pour RASCHKE. Lorsque nous avons défini le critère utilisé pour la mesure de la vitesse du mouvement des stomates, nous avons rejeté le critère utilisé par RASCHKE parce que trop imprécis. Pour nous, la vitesse d'ouverture est affectée par la température mais pas le degré d'ouverture maximum, sauf toutefois pour certaines feuilles au-dessus de 30°C.

Les contradictions observées en ce qui concerne le degré d'ouverture maximum des stomates obtenu pour différentes températures peuvent s'expliquer par le rôle important des températures auxquelles les plantes sont soumises avant l'expérience proprement dite. Il semble que là encore, l'appareil stomatique doive s'adapter aux températures plus élevées et que le degré d'ouverture maximum pourra être obtenu quand même pour des températures de l'ordre de 40°C chez le Pelargonium à condition qu'au préalable les plantes aient séjourné à 30°C au lieu de 20°C qui sont nos conditions habituelles. En ce qui concerne les températures inférieures à 13°C RASCHKE trouve que le degré d'ouverture est supérieur à celui obtenu entre 13 et 18°C (p.359). L'auteur interprète ceci en supposant que le mouvement de fermeture est plus affecté par les basses températures que celui d'ouverture. Or, c'est ce que nous avons démontré : les stomates ne peuvent plus se fermer au-dessous de 4°C. Enfin RASCHKE discute les effets possibles de la température d'une part sur la viscosité de l'eau, d'autre part sur la solubilité du gaz carbonique dans l'eau. Il compare les énergies d'activation de ces deux processus et estime qu'ils ne peuvent rendre compte de l'énergie d'activation calculée à partir de la vitesse du mouvement des stomates. Nous n'avons réalisé aucune expérience en ce sens, mais les hypothèses formulées

par RASCHKE nous apparaissent tout à fait plausibles.

Conclusions.

Il semble donc que la température agisse directement sur les mécanismes biochimiques de l'ouverture et de la fermeture des stomates, que ce soit à l'obscurité chez le *Pelargonium X hortorum* ou à la lumière chez *Zea mays* (RASCHKE).

Dans sa conclusion, RASCHKE s'exprime ainsi : " Determination of stomatal opening and closing velocities as functions of temperature appear therefore, to be desirable". Notre travail répond à ce souhait ; il constitue à notre connaissance la première preuve expérimentale de l'existence d'un mécanisme différent pour l'ouverture et la fermeture puisque les stomates réagissent différemment en fonction de la température.Cette hypothèse déjà formulée de manière théorique par LEVITT (1967) demande une confirmation ; or celle-ci pourrait venir des expériences concernant les effets de l'oxygène sur le mouvement des stomates à l'obscurité. Ces expériences vont nous permettre d'acquérir une meilleure connaissance sur la nature des mouvements des stomates chez le *Pelargonium X hortorum*.

- CHAPITRE III -

INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE, DES TENSIONS PARTIELLES D'OXYGENE ET DES INHIBITEURS D'OXYDATION SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES A L'OBSCURITE. MOUVEMENTS ACTIFS ET PASSIFS DES STOMATES.

1 - EFFETS D'UNE LIMITATION DES OXYDATIONS SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES DE FEUILLES MAINTENUES SUR PIED.

Introduction.

L'examen des effets de conditions d'oxydations limitantes nous amène à préciser d'abord la notion de mouvement "actif et passif".

Une certaine confusion règne sur la définition des termes "actif et passif" pour désigner certains types de mouvements des stomates. STÅLFELT (1955) introduit le premier la notion de mouvements "photoactifs" c'est-à-dire dont l'origine se trouve dans les cellules stomatiques elles-mêmes (actifs) et qui se produisent lors de la fourniture ou de la suppression de la lumière. Ces mouvements ne sont possibles que s'il existe un déficit hydrique qualifié "d'optimal" c'est-à-dire qui ne produit aucun effet particulier sur le degré d'ouverture des stomates. Lorsque ce déficit croît, il devient "suboptimal", et les cellules épidermiques compagnes subissent des variations de turgescence plus rapides et plus importantes que celles des cellules stomatiques ; elles exercent alors une moindre pression sur les cellules stomatiques et les stomates s'ouvrent passivement. Le phénomène est réversible. Enfin, lorsque le

Fig. 38. Inhibition du mouvement d'ouverture des stomates à l'obscurité en anaérobiose.

N_2 = azote.

- CO_2 = azote ou air (a) dépourvu de gaz carbonique.

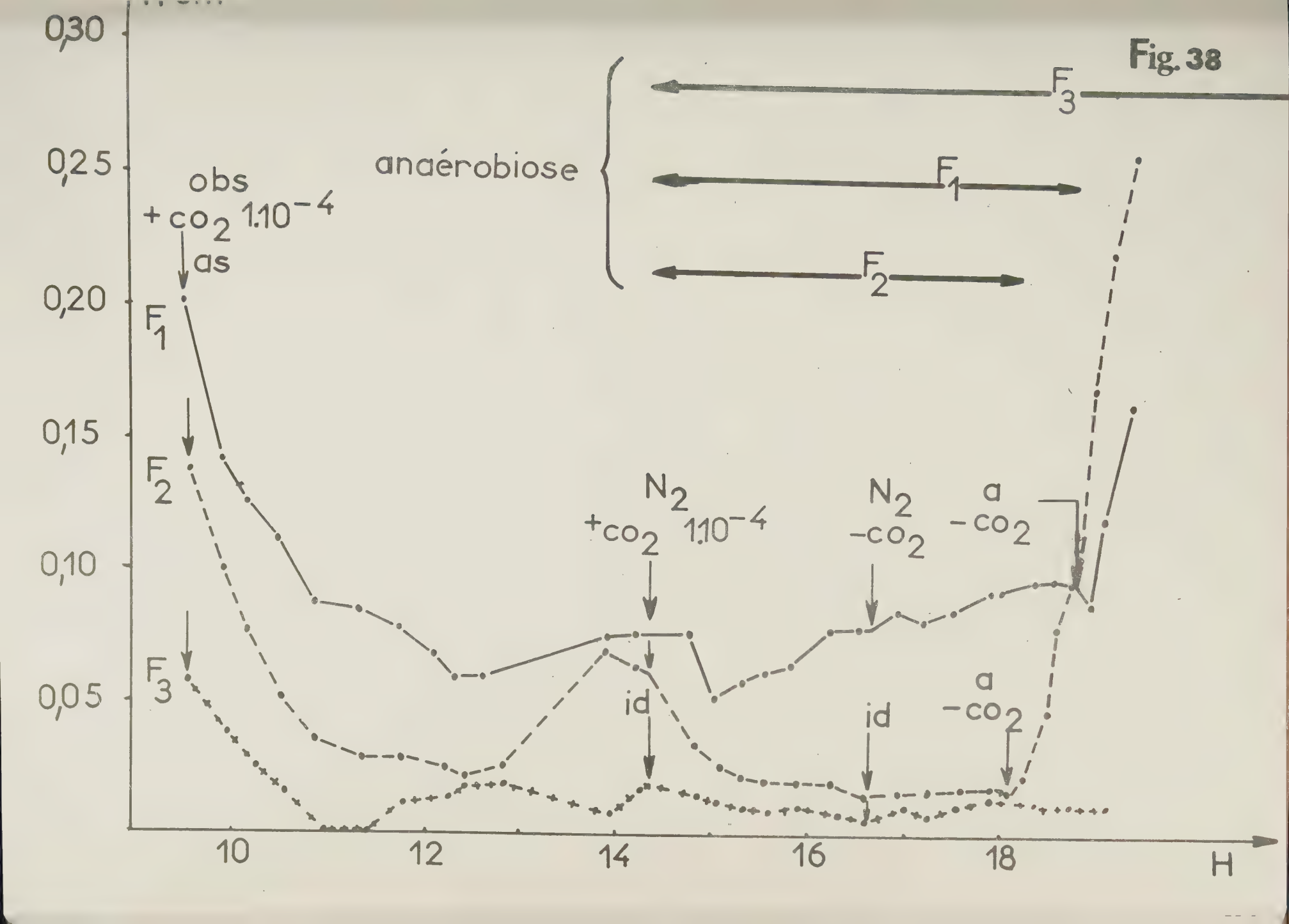


Fig. 38
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
anaérobiose
F3
F1
F2
obs
+co2 1.10−4
as
F1
F2
F3
N2
+co2 1.10−4
N2
−co2
a
−co2
id
id
a
−co2
10
12
14
16
18
H

déficit hydrique atteint une valeur critique, il devient "supraoptimal" et les cellules stomatiques perdent de l'eau, ce qui a pour effet d'entraîner la fermeture des stomates en présence de lumière : mouvement "hydroactif". Un des inconvénients de cette classification, ainsi que l'a souligné LEVITT (1967), c'est l'ignorance d'un troisième type de mouvements, l'ouverture à l'obscurité. MEIDNER et MANSFIELD (1968 p. 94) soulignent également que la fermeture "hydroactive" est plus complexe que STÅLFELT ne l'indiquait.

Nous avons choisi une autre acception de la notion de mouvement "actif et passif" qui sera justifiée par les expériences décrites ultérieurement. Un mouvement sera dit "actif" lorsqu'il s'accompagne d'un changement métabolique exigeant la fourniture d'énergie, il sera dit "passif" lorsqu'il sera la conséquence de mouvements d'eau sans faire appel à une source d'énergie d'origine métabolique. Nous rejoignons ainsi le sens généralement donné aux mots "actif" et "passif". Cette classification permettra, comme nous le verrons, de faire entrer tous les types de mouvements connus dans l'une ou l'autre de ces catégories. Le premier problème que nous devons résoudre est donc le suivant : quels sont les besoins en oxygène des mouvements des stomates à l'obscurité ? Pour cela nous limiterons les conditions d'oxydation de feuilles d'orge maintenues sur pied.

1-1. Influence de l'anaérobiose.

Les effets de l'anaérobiose sur le mouvement des stomates ont été examinés par divers auteurs : SCARTH et collaborateurs (1933), FREUDENBERGER (1940), HEATH et ORCHARD (1956), WALKER et ZELITCH (1963), ZELITCH (1963), FUJINO (1967), RASCHKE (1967) et LOUGUET (1968). WILLIAMS (1954) avait émis l'hypothèse suivante :

- le mouvement le plus important est celui de fermeture;
- c'est un mouvement de type "actif", actif étant pris dans le sens que nous avons adopté, c'est-à-dire qu'il exige la fourniture d'énergie.

Selon HEATH et ORCHARD le mouvement de fermeture peut se produire en anaérobiose, ce qui refute l'hypothèse de WILLIAMS. En outre, WALKER et ZELITCH ont montré que les mouvements d'ouverture et de fermeture étaient inégalement et partiellement inhibés. SCARTH et RASCHKE ont montré que des conditions anaérobies pouvaient favoriser une ouverture soit à l'obscurité soit à la lumière. FUJINO a tenté de mettre en évidence le rôle de l'ATP et d'ATPases dans le mouvement des stomates.

Il était intéressant de vérifier si à l'obscurité les mouvements des stomates liés aux variations de la teneur en gaz carbonique de l'air sont inhibés en anaérobiose.

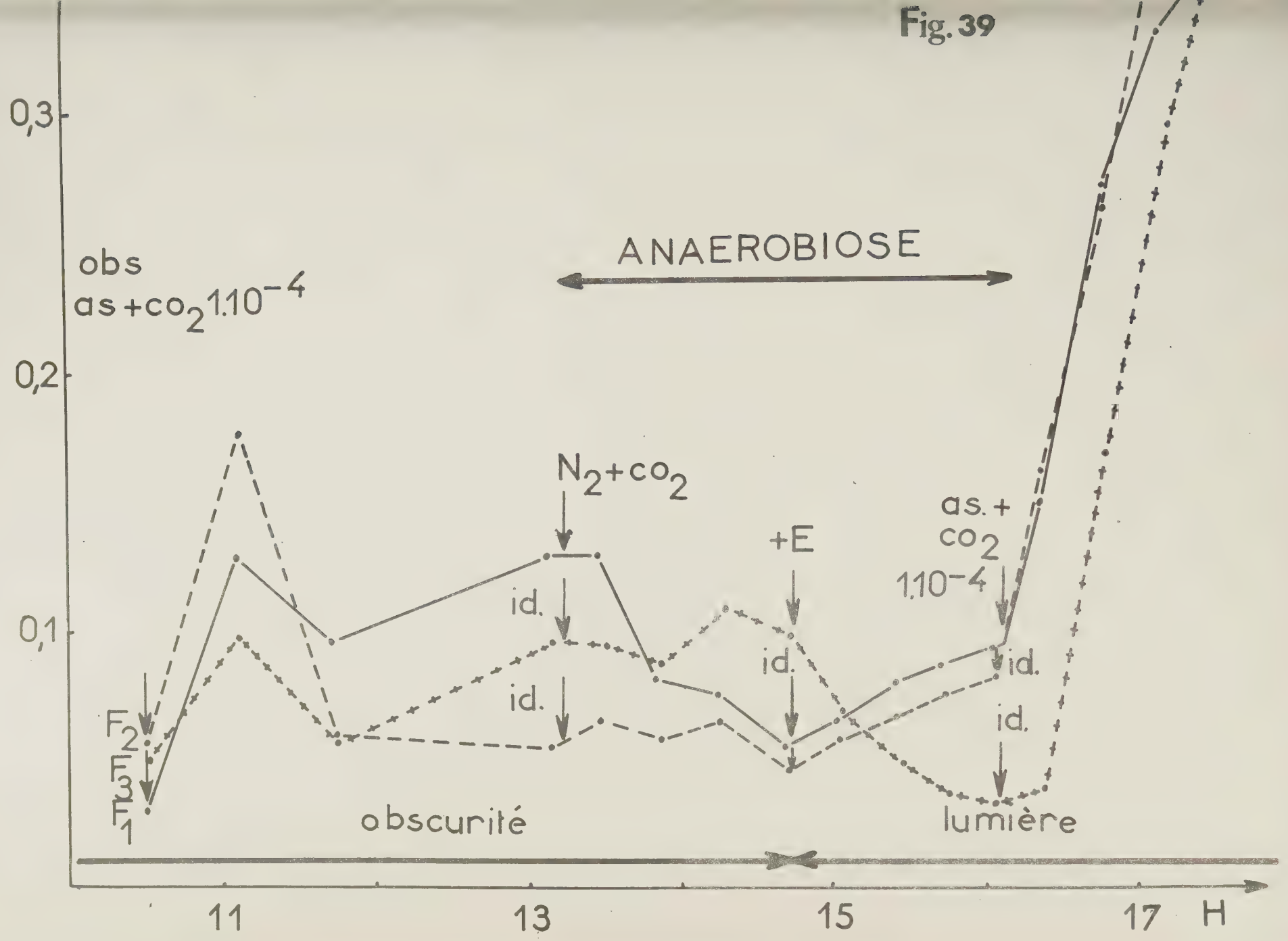
11-1. Inhibition du mouvement d'ouverture à l'obscurité en anaérobiose.

111-1. Conditions de l'expérimentation.

Dans l'expérience décrite fig. 38 les feuilles sont d'abord balayées par de l'air contenant du gaz carbonique à la concentration 1.10^{-4} ; cette

Fig. 39. Inhibition du mouvement d'ouverture des stomates par passage obsc
lumière en anaérobiose.

Fig. 39


0,3
0,2
0,1
obs
as + co_2 1.10^{-4}
ANAEROBIOSE
$N_2 + co_2$
+E
as. + co_2 1.10^{-4}
id.
id.
id.
id.
id.
F_2
F_3
F_1
obscurité
lumière
11
13
15
17
H

teneur permet l'obtention d'un équilibre correspondant à une faible ouverture stomatique aisément appréciée grâce à notre méthode. Cette faible ouverture suffit pour permettre les échanges gazeux par diffusion libre et ainsi la mise en équilibre de la teneur en gaz carbonique de l'atmosphère interne de la feuille avec celle de l'air de balayage ; on remplace l'air de balayage par de l'azote de même teneur en gaz carbonique (N_2 + CO_2 1.10^{-4}). Le maintien de cette concentration est impératif car l'oxygène dissous dans le suc cellulaire ne s'élimine probablement pas immédiatement et dans ces conditions toute variation de la teneur en gaz carbonique entraînerait une modification du degré d'ouverture des stomates. Après deux heures de balayage on fournit de l'azote sans gaz carbonique (N_2 - CO_2).

Ensuite à des intervalles de temps échelonnés, de l'air dépourvu de gaz carbonique (a - CO_2) est fourni d'abord à la feuille F_2 (F_1 et F_3 maintenues dans l'azote servant de témoins) puis à la feuille F_1, F_3 restant dans l'azote.

I-2. Résultats.

Le passage de l'air à l'azote de même concentration en gaz carbonique n'entraîne pas de modification de l'ouverture des stomates.

Le passage en azote dépourvu de gaz carbonique n'entraîne pas de *modification de l'ouverture des stomates, contrairement à ce que l'on observerait dans l'air sans gaz carbonique, où les stomates s'ouvriraient immédiatement*. Le retour échelonné de F_2 et F_1 dans l'air dépourvu de gaz carbonique permet d'observer l'importante ouverture prévisible ce qui montre que le mécanisme d'ouverture des stomates n'a pas été altéré irréversiblement dans l'azote.

II-2. Inhibition du mouvement d'ouverture à la lumière en anaérobiose.

Dans l'expérience correspondant à la fig. 39 nous avons voulu observer l'effet de la lumière en anaérobiose, puisque la lumière est la cause de l'ouverture des stomates dans les conditions naturelles.

II2-1. Conditions de l'expérimentation.

Un balayage par de l'air contenant 0,01% de gaz carbonique permet d'obtenir une ouverture des stomates relativement stable (as + CO_2 1.10^{-4}). Puis on inhibe le mouvement des stomates par passage dans l'azote de même teneur en gaz carbonique (N_2 + CO_2 1.10^{-4}). Après un temps de balayage suffisant, on fournit la lumière (+E) les feuilles étant toujours maintenues dans l'azote. Enfin l'air est de nouveau fourni (as + CO_2 1.10^{-4})

II2-2. Résultats.

Le passage en azote (N_2 + CO_2 1.10^{-4}) n'entraîne pas de variations importantes

Fig. 40. Inhibition du mouvement de fermeture des stomates à l'obscurit
anaérobiose.

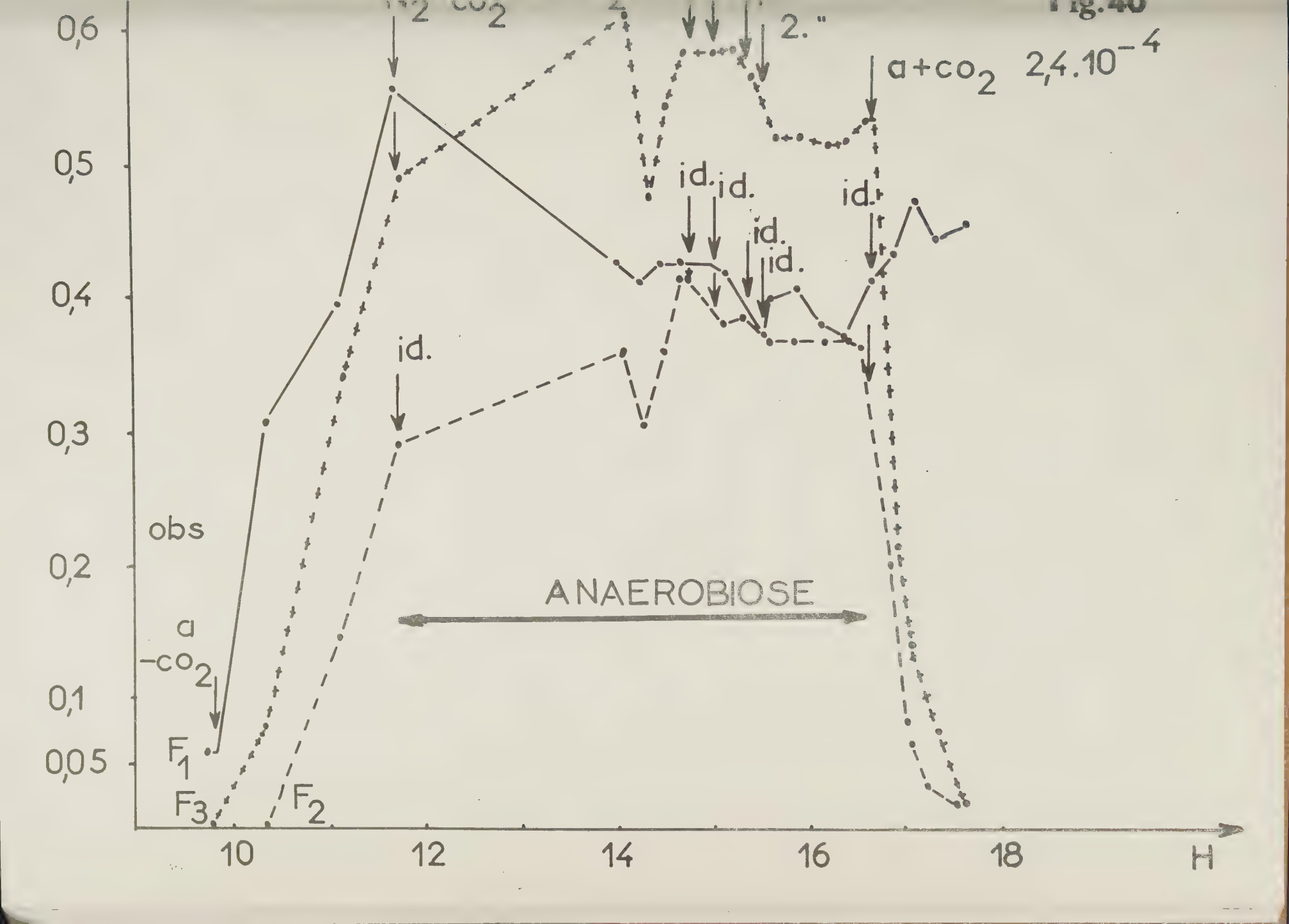


Fig.40
2,4.10⁻⁴
a+co2
2."
id.
id.
id.
id.
id.
id.
ANAEROBIOSE
obs
a
-co2
F1
F2
F3
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,05
10
12
14
16
18
H

de l'ouverture des stomates (fig. 38). Les mouvements de faible amplitude sont probablement d'origine endogène et dûs à des transferts d'eau.

L'interruption du balayage par l'air au moment de la fourniture d'azote doit être aussi brève que possible ; toute interruption prolongée au-delà d'une minute entraîne une fermeture brutale des stomates très probablement passive. La fourniture de lumière (+E) entraîne un mouvement d'ouverture de très faible amplitude pour F_1 et F_2. Dans le cas de F_3, le mouvement de fermeture d'origine endogène masquerait le mouvement d'ouverture à la lumière ; la fourniture d'air en présence de lumière permet d'obtenir l'ouverture prévisible importante. *La comparaison des vitesses d'ouverture dans l'azote et dans l'air mesurées par l'accroissement de* Π *après une heure de traitement, montre que le pourcentage d'inhibition est de 88 % pour* F_1 *et de 90% pour* F_2 *; il a donc une valeur très élevée.*

II-3. Inhibition du mouvement de fermeture par fourniture de CO_2 à l'obscurité en anaérobiose.

II3-1. Conditions expérimentales.

L'expérience correspondant à la figure 40 reflète les résultats obtenus au cours d'une série d'essais comparables. Les plantes maintenues à l'obscurité dans l'air présentent des stomates fermés ou très peu ouverts.

Dans un premier temps on fait ouvrir normalement les stomates par de l'air dépourvu de gaz carbonique afin d'obtenir un degré d'ouverture élevé ($a\text{-}CO_2$).

Puis on fournit de l'azote sans gaz carbonique ($N_2 - CO_2$).

Après un balayage de trois heures dans ces conditions on fait circuler de l'azote enrichi progressivement en gaz carbonique, pendant deux heures.

Ensuite on retourne à l'air contenant autant de gaz carbonique que l'azote ($2{,}4.10^{-4}$).

II3-2. Résultats.

- les stomates se maintiennent ouverts en azote sans gaz carbonique ($N_2 - CO_2$).

- L'augmentation de la teneur en gaz carbonique de l'azote ($0{,}7.10^{-4}$) n'entraîne pas la fermeture des stomates *alors qu'en présence d'oxygène la fermeture serait immédiate.*

- Le retour dans l'air ($a + CO_2$ $2{,}4.10^{-4}$) provoque une fermeture immédiate et complète pour F_2 et F_3, mais nulle pour F_1.

- *Le mouvement de fermeture est donc inhibé en absence d'oxygène.* La fermeture dans l'air prouve que le mécanisme du mouvement des stomates

Fig. 41. Inhibition du mouvement de fermeture des stomates par passage
la lumière à l'obscurité en anaérobiose.

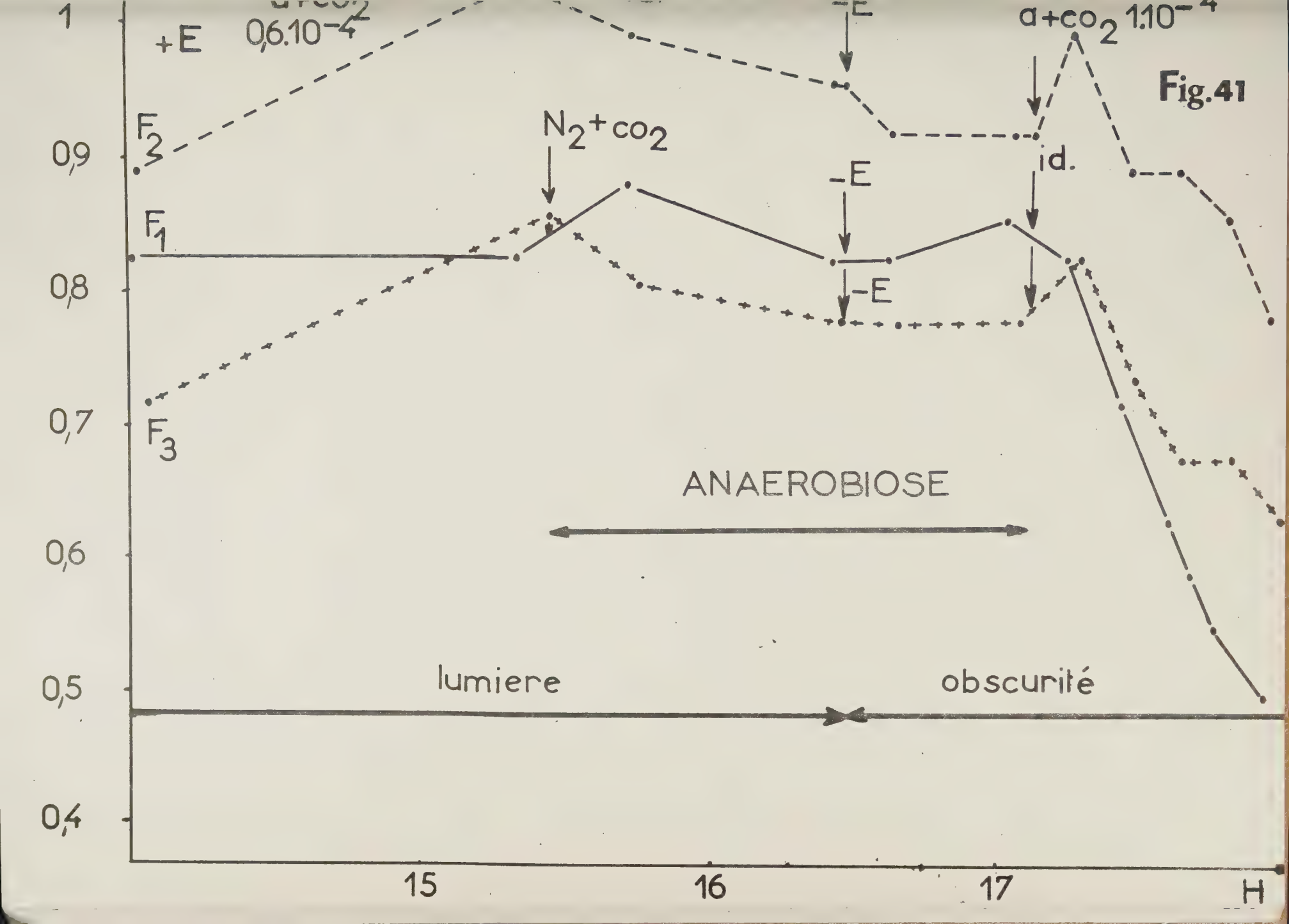

1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
+E
0,6.10⁻⁴
F2
F1
F3
N2+co2
-E
-E
-E
id.
a+co2 1.10⁻⁴
ANAEROBIOSE
lumiere
obscurité
15
16
17
H

Fig.41

n'est pas altéré irréversiblement pour F_2 et F_3 après cinq heures dans l'azote, ce qui ne semble pas être le cas pour F_1 ; en effet le lendemain, F_1 est nécrosée et jaunie alors que F_2 et F_3 sont vertes et turgescentes.

II-4. Inhibition du mouvement de fermeture par passage de la lumière à l'obscurité en anaérobiose.

Cette expérience est analogue à celle de HEATH et ORCHARD (1956).

II4-1. Conditions expérimentales.

Ainsi qu'on peut le voir sur la figure 41, les feuilles sont d'abord balayées à la lumière (contrairement aux expériences précédentes), par de l'air de teneur en CO_2 1.10^{-4} réduite à $0,6.10^{-4}$ par une active photosynthèse.

Dans ces conditions, l'ouverture des stomates est pratiquement maximale.

Puis, toujours à la lumière, l'air de balayage est remplacé par l'azote ayant la même teneur en CO_2.

Après une heure de balayage, la fourniture de lumière est supprimée (-E).

Enfin, on fournit de l'air ayant toujours la même teneur en gaz carbonique.

II4-2. Résultats.

A la lumière, le passage de l'air en azote (N_2 + CO_2 id.) n'entraîne aucune modification.

Si l'on supprime la lumière on n'observe aucune fermeture; nous sommes donc ici en désaccord avec HEATH et ORCHARD.

Le retour dans l'air entraîne la fermeture attendue des stomates.

La fermeture des stomates par passage lumière-obscurité est donc inhibée en anaérobiose chez le Pelargonium X hortorum.

II-5. Discussion.

L'inhibition au moins partielle du mouvement d'ouverture dans l'azote n'est pas contestée par divers auteurs, mais, à notre connaissance, on n'a jamais décrit précédemment l'inhibition du mouvement de fermeture. Une différence lors du passage en anaérobiose en ce qui concerne les deux types de mouvement impliquerait deux mécanismes différents pour l'ouverture et pour la fermeture. Pour tenter d'expliquer les différences entre les conclusions de HEATH et ORCHARD et les nôtres, nous allons comparer les modes opératoires et le matériel utilisé. Nous essaierons ensuite de conclure.

115-1. Comparaison avec les résultats antérieurs.

1151-1. Les modes opératoires.

Ils sont essentiellement différents : nous étudions les mouvements des stomates à l'obscurité alors que HEATH et ORCHARD étudient l'effet du passage de la lumière à l'obscurité. Toutefois, les résultats de l'expérience décrite fig. 41 qui répète celle de HEATH et ORCHARD, sont en contradiction avec ceux de ces auteurs, peut-être pour les raisons suivantes :

- Le temps de balayage par l'azote à la lumière (1/4 d'heure) utilisé par HEATH et ORCHARD nous paraît court ; il ne permet probablement pas d'éliminer tout l'oxygène des tissus.

- Le moment choisi par les auteurs pour changer la composition de l'atmosphère " when both leaf areas showed a somewhat similar porometer reading", ne semble pas être le meilleur. En effet dans nos conditions expérimentales, une mise en équilibre des stomates exige de trois à quatre heures et, d'autre part, nous avons remarqué que le degré d'ouverture finalement atteint dans des conditions déterminées est très généralement inférieur au maximum atteint pendant la phase de mise en équilibre.

1151-2. Le choix du matériel expérimenté.

Le matériel choisi par HEATH et ORCHARD est le Blé, le nôtre est le *Pelargonium X hortorum*. Pour savoir si nos résultats sont généralisables nous avons étudié le mouvement des stomates chez le Maïs (*Zea mays*, var. INRA 260). Les expériences ont montré qu'en *anaérobiose l'ouverture* des stomates à la lumière est inhibée. L'anaérobiose n'empêche pas la fermeture des stomates en accord donc avec les expériences de HEATH et ORCHARD ; toutefois, la comparaison des vitesses de fermeture dans l'air et dans l'azote montre que l'inhibition dans l'azote est de 90%. Finalement, l'anaérobiose inhibe donc totalement ou fortement le mouvement de fermeture provoqué par le passage lumière-obscurité.

115-2. Essais d'explication des effets de l'anaérobiose.

1152.-1. Cas du Pelargonium.

A l'obscurité, les mouvements des stomates liés aux variations de teneur en gaz carbonique sont inhibés en anaérobiose. Les mouvements d'ouverture et de fermeture provoqués par l'apport et la suppression de la lumière sont également inhibés. Ces mouvements paraissent donc "actifs". L'oxygène intervient probablement en rendant possible la synthèse d'une quantité suffisante d'ATP par phosphorylation oxydative.

La fermeture et l'ouverture exigeraient toutes deux de l'ATP ; cela ne signifie pas obligatoirement que l'entrée ou la sortie de l'eau soit de type "actif", mais peut signifier que les transformations de substances intervenant dans le mouvement des stomates exigent de l'énergie

Ces observations sont confirmées par les travaux de FUJINO (1967). Cet auteur montre que l'ouverture et la fermeture des stomates sont des processus chimiques qui consomment de l'énergie. Particulièrement il observe une hydrolyse importante de l'ATP à l'obscurité. Le travail de FUJINO et le nôtre sont parmi les rares publications signalant cette exigence en oxygène pour la fermeture des stomates.

1152-2. Cas du Maïs.

Afin d'interpréter les faits observés en aérobiose, on peut se demander si le Maïs n'aurait pas une intensité respiratoire supérieure à celle du Pelargonium, ce qui pourrait entraîner une augmentation de la teneur en gaz carbonique des cellules stomatiques, mais ce n'est pas le cas; toutefois il n'est pas impossible que, chez le Maïs, la teneur en gaz carbonique des espaces intercellulaires soit légèrement supérieure à celle du Pelargonium à l'obscurité, ce qui pourrait être confirmé indirectement par l'observation qu'un faible éclairement (200 lux environ) suffit pour rendre similaires les mouvements des stomates des deux espèces. Il y aurait donc non une différence profonde de comportement des stomates, mais des problèmes liés à la physiologie de la feuille et nous rejoignons en cela l'opinion de KETELLAPPER (1963). En l'absence d'oxygène cette fois, on peut imaginer une explication de l'inhibition partielle du mouvement de fermeture chez le Maïs. Cette plante fermenterait plus activement que le Pelargonium ce qui permettrait la formation de plus d'ATP en anaérobiose. Remarquons que la vitesse de fermeture est réduite à 10% de la vitesse maximale. Or l'ATP fermentaire est fourni en quantité moins importante que l'ATP respiratoire à consommation égale de glucides. Une confirmation de cette hypothèse pourrait découler de l'observation selon laquelle l'anaérobiose entraîne la formation de produits toxiques (éthanol probablement) beaucoup plus rapidement chez le Maïs que chez le Pelargonium, car le mécanisme du mouvement des stomates du Maïs est détérioré après un séjour de deux heures dans l'azote, alors que nous avons vu que le Pelargonium pouvait supporter un séjour en anaérobiose pendant 5h au moins (fig. 40).

Si cette hypothèse était exacte, la différence qui apparaîtrait entre les mouvements d'ouverture et de fermeture serait l'exigence d'une synthèse en ATP plus importante pour les premiers que pour les seconds.

Nos expériences confirment d'ailleurs curieusement les observations incidentes de GREGORY et ARMSTRONG (1937) qui avaient constaté que l'hydrogène fourni de façon *permanente* à une feuille empêche les stomates de se fermer la nuit, ce qui s'explique parfaitement comme une conséquence de l'anaérobiose.

L'ouverture et la fermeture des stomates à l'obscurité en fonction de la teneur en gaz carbonique de l'air sont donc des mouvements "actifs" selon notre définition du terme. Nous venons de suggérer que les mouvements de fermeture seraient moins exigeants pour l'oxygène que les mouvements d'ouverture. Afin d'éclaircir ce point, nous avons examiné l'influence

des pressions partielles d'oxygène sur la vitesse d'ouverture et de fermeture des stomates à l'obscurité.

1-2. Influence des faibles pressions partielles d'oxygène.

L'anaérobiose inhibe totalement le mouvement d'ouverture et de fermeture des stomates à l'obscurité chez le *Pelargonium X hortorum*. Il est intéressant de rechercher d'une part pour quelle pression partielle d'oxygène l'inhibition peut être levée, et d'autre part quelle est l'influence de la pression partielle d'oxygène sur la vitesse d'ouverture et de fermeture des stomates. Parmi les rares publications concernant l'influence de l'oxygène sur le degré d'ouverture des stomates, on peut citer une publication déjà ancienne de SCARTH, WHYTE et BROWN (1933). Ces auteurs montrent que la diminution de la teneur en oxygène de l'air provoque une ouverture des stomates à l'obscurité. Malheureusement le manque d'informations précises concernant les méthodes expérimentales et le matériel utilisé ne permet pas de discuter ces résultats. Quant au *Pelargonium X hortorum*, des stomates fermés à l'obscurité en air normal ne se sont jamais ouverts dans l'azote même après un temps de séjour prolongé. Plus récemment les résultats de GAUHL et BJORKMAN (1969) montrent que la résistance stomatique à la diffusion du gaz carbonique n'est pas affectée par la teneur en oxygène, ce que confirme également LUDLOW (1970). Par contre, *aucune publication se réfère à l'influence des faibles pressions partielles d'oxygène sur la vitesse de mouvement des stomates.*

12-1. Conditions d'étude du rôle des pressions partielles d'oxygène.

Les conditions générales de l'expérimentation sont maintenues. L'étude est faite à la température de 20°C.

Les termes "traitements d'ouverture et de fermeture" conservent la même signification que pour l'étude du rôle de la température.

Les mélanges oxygène-azote sont obtenus à partir de bouteilles de gaz comprimés du commerce. Toutefois et afin de ne pas multiplier les mélanges gazeux nous avons opéré diverses dilutions à partir d'un mélange 99,75% d'azote et 0,25% d'oxygène jusqu'à une pression partielle d'oxygène de 0,005%. A de l'azote très pur débité à 60 litres h^{-1} on ajoute un débit convenable du mélange gazeux désigné ci-dessus dont la valeur est contrôlée par des gyromètres et un débitmètre à capillaires de résistances différentes. Afin de vérifier avec exactitude le rapport de dilution nous avons opéré dans les mêmes conditions mais en ajoutant cette fois à l'azote pur un mélange azote-gaz carbonique à 0,02% provenant d'une bouteille étalon. La mesure de la dilution est réalisée de manière très précise grâce à l'analyseur de gaz carbonique. L'erreur relative peut être estimée à 5% pour des valeurs de la pression partielle d'oxygène supérieures à 0,06%; au-dessous de 0,06% l'erreur relative sur la détermination des pressions partielles peut atteindre 10%. Comme dans l'étude du rôle de la température, la variabilité des vitesses des mouvements des stomates déjà importante pour une même feuille en bon état physiologique pour des expériences successives identiques rend l'interprétation d'un trop petit nombre de résultats très délicate ; c'est pourquoi un nombre suffisant de mesures est effectué et

Fig. 42. Courbes représentatives de la levée d'inhibition du mouvement d'ouverture des stomates pour une concentration d'oxygène en volume de 5.10^{-5}, (+ O_2 5.10^{-5}).

Fig. 43. Id. Concentration en oxygène 1.10^{-4} mêmes feuilles.

Fig. 44. Id. Concentration en oxygène 2.10^{-4} mêmes feuilles.

Fig. 45. Id. Concentration en oxygène 3.10^{-4} mêmes feuilles.

Fig. 46. Courbes représentatives de la levée d'inhibition du mouvement de fermeture des stomates.

Fig. 42

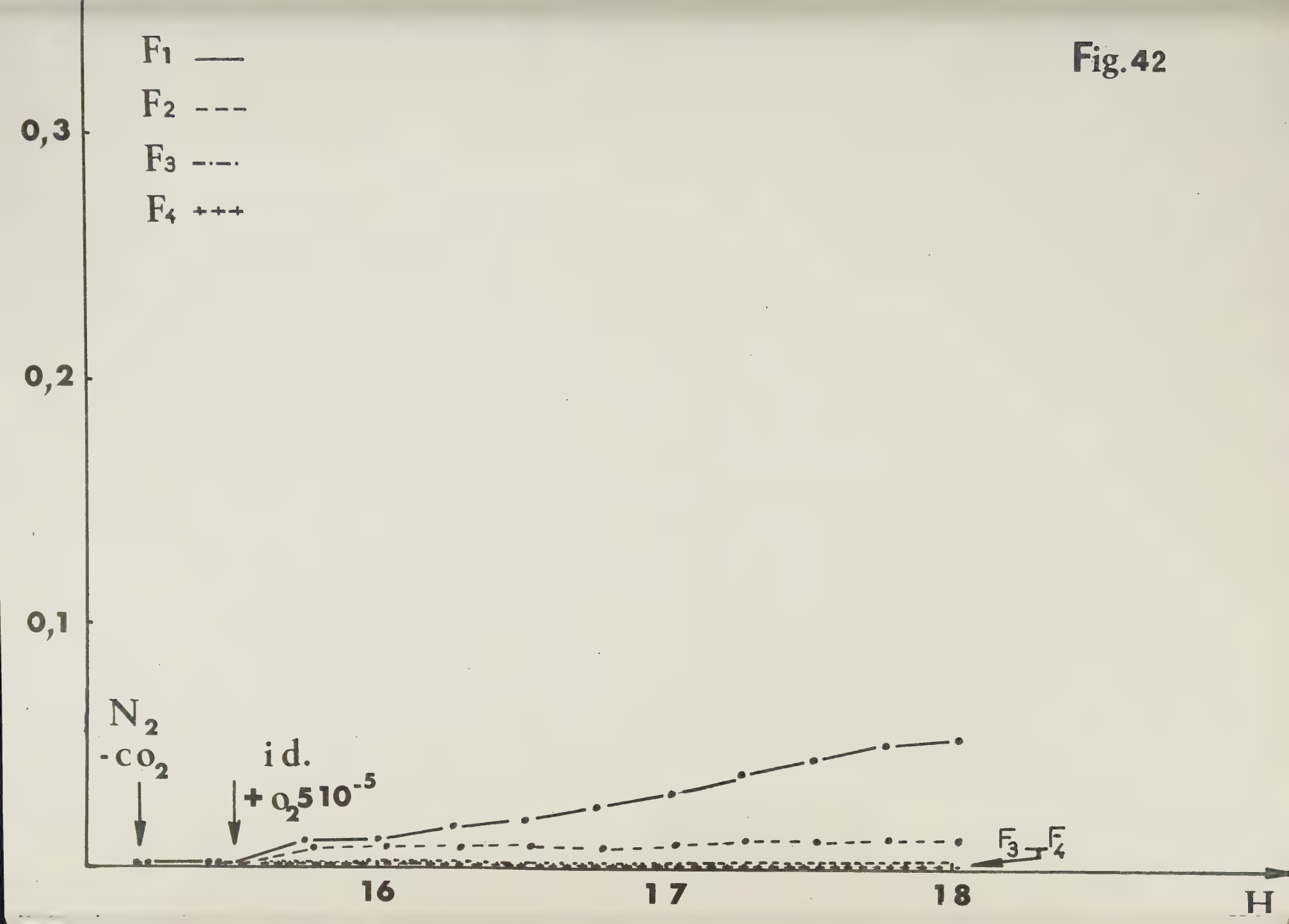


Fig.43

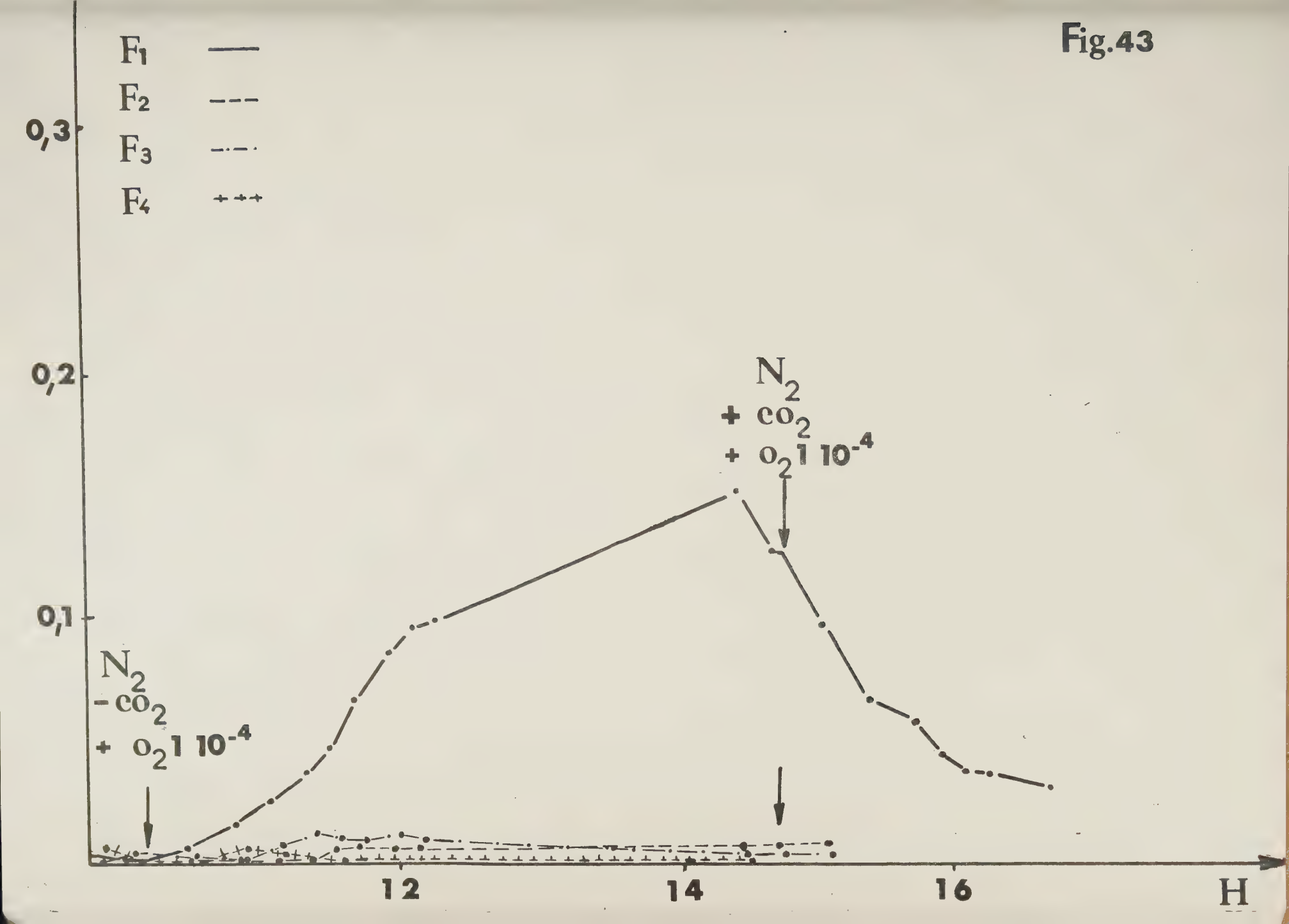


Fig. 44

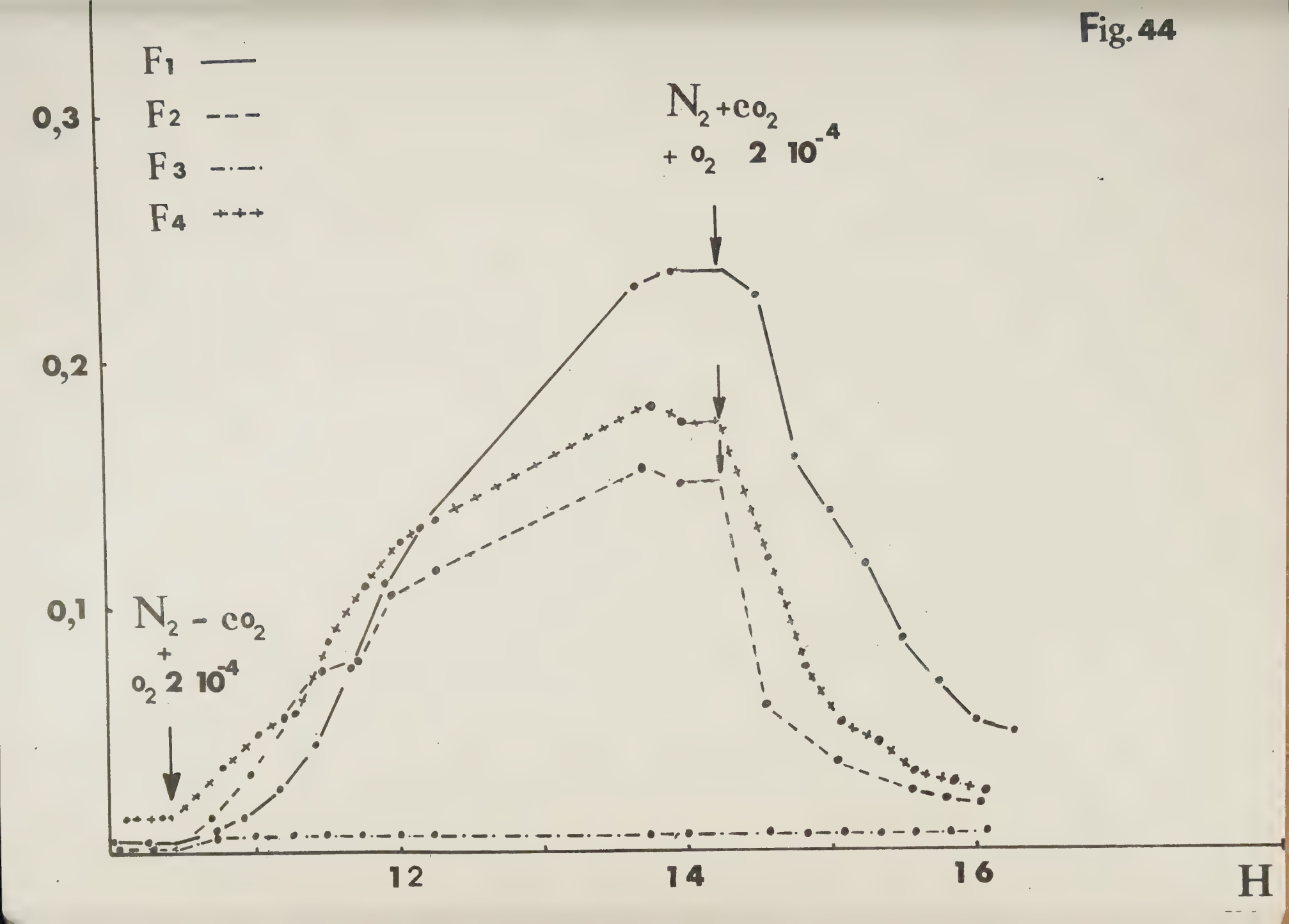
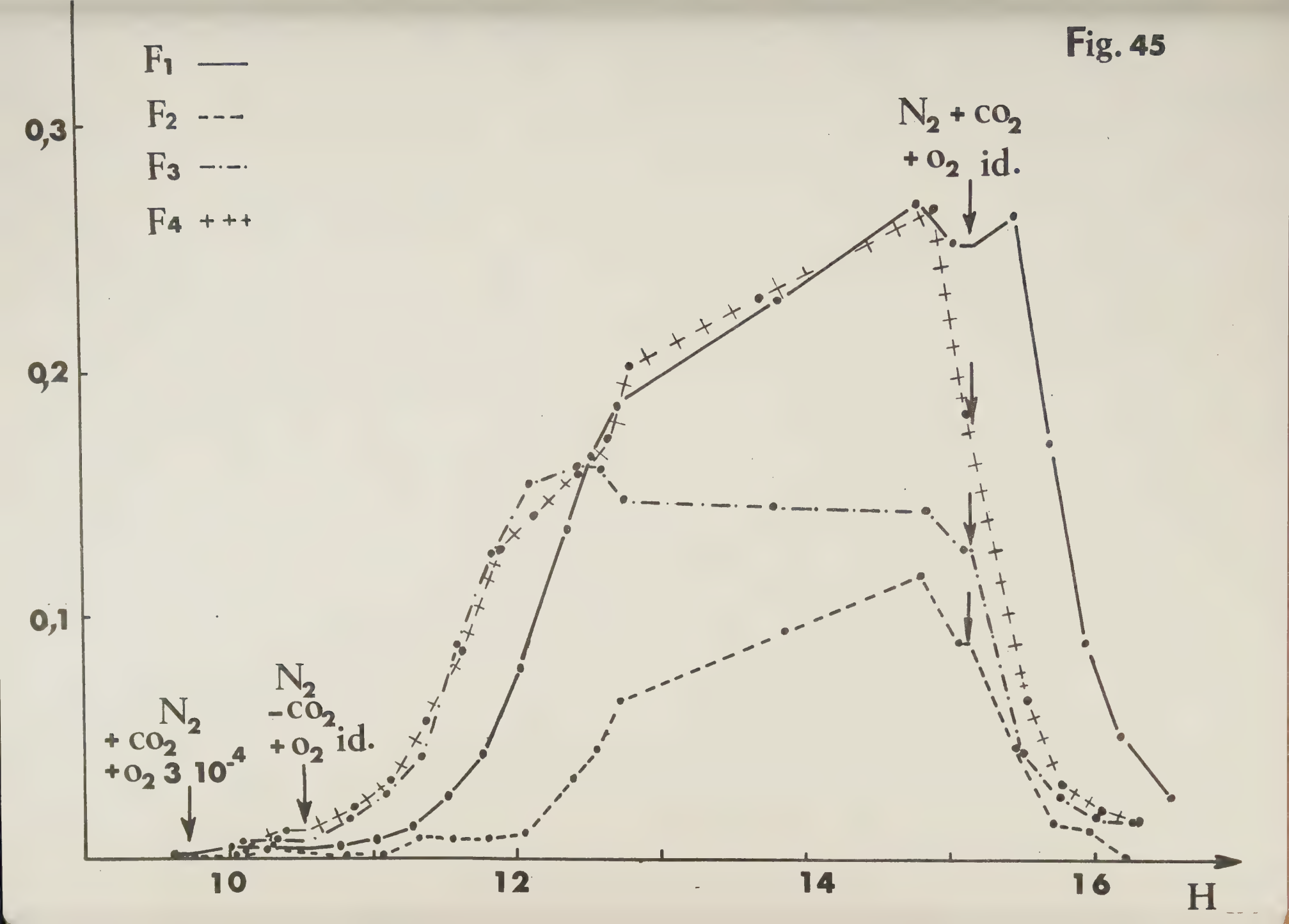


Fig. 45


F1 ——
F2 - - -
F3 —·—·
F4 + + +
0,3
0,2
0,1
N2 + co2 + o2 id.
N2 + co2 + o2 3 10-4
N2 - co2 + o2 id.
10
12
14
16
H

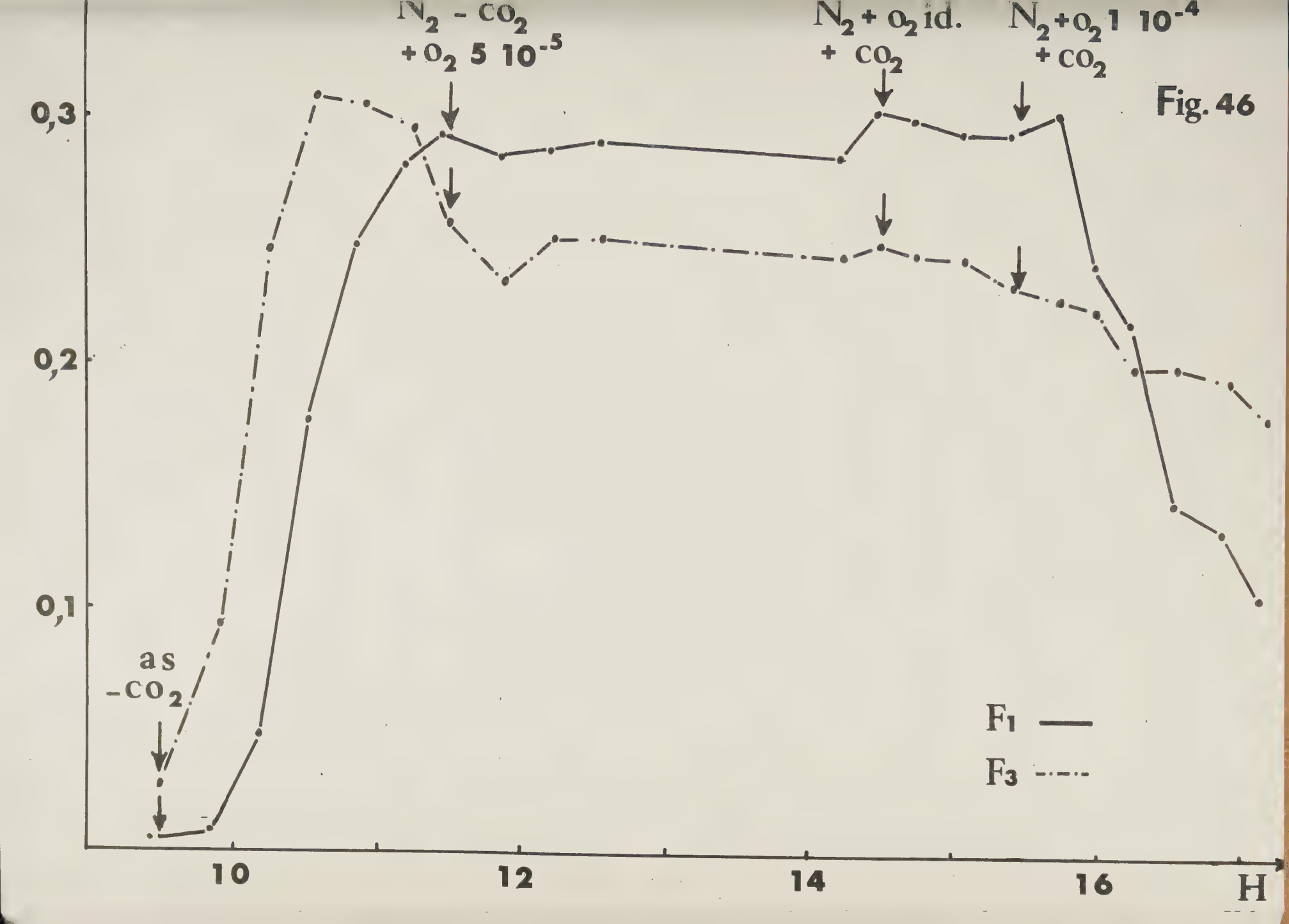

$N_2 - CO_2$
$+ O_2$ 5 10^{-5}
$N_2 + O_2$ id.
$+ CO_2$
$N_2 + O_2$ 1 10^{-4}
$+ CO_2$
0,3
0,2
0,1
as
$-CO_2$
10
12
14
16
H
F_1
F_3

Fig. 46

les résultats sont soumis à une analyse statistique dans la mesure du possible.

12-2. Détermination de la pression partielle d'oxygène minimale nécessaire pour lever l'inhibition du mouvement des stomates en anaérobiose.

122-1. Levée d'inhibition de l'ouverture des stomates.

Nous avons augmenté progressivement la pression partielle d'oxygène du mélange azote-oxygène dépourvu de gaz carbonique.

1221-1. Protocole expérimental.

Les plants de Pelargonium éclairés pendant la nuit sont soumis à l'expérimentation après trois heures d'obscurité. Dans un premier temps on soumet les plantes à un balayage par de l'azote sec dépourvu de gaz carbonique. Les stomates restent fermés. Puis le mélange azote-oxygène est fourni.

1221-2. Résultats.

La concentration en volume de l'oxygène dans l'azote est successivement de 5.10^{-5} (0,005%) (fig. 42), 1.10^{-4} (fig. 43), 2.10^{-4} (fig. 44), 3.10^{-4} (fig. 45). Les expériences ont porté sur les mêmes feuilles, la teneur en oxygène augmentant chaque jour.

On remarque que sur la figure 42, seuls les stomates de la feuille 1 s'ouvrent, l'inhibition n'est pas levée pour F_2, F_3, F_4. Puis successivement les stomates de F_2 et F_4 (fig. 44) s'ouvrent à leur tour pour la teneur en O_2 de 2.10^{-4}, enfin pour 3.10^{-4} ceux de F_3.

122-2. Levée d'inhibition de la fermeture des stomates.

1222-1. Protocole expérimental.

On fait ouvrir les stomates au maximum en air dépourvu de gaz carbonique. Lorsque le maximum est atteint, le mélange azote-oxygène à 5.10^{-5} est fourni aux feuilles puis on essaie d'obtenir la fermeture en envoyant le gaz carbonique à 3.10^{-4}.

1222-2. Résultats.

Sur la figure 46 il apparaît que la concentration en oxygène 5.10^{-5} ne peut lever l'inhibition de la fermeture par contre la teneur 1.10^{-4} entraîne un début de fermeture pour F_3 et une fermeture nette pour F_1.

122-3. Généralisation des résultats.

Lorsque ce type d'expériences est réalisé plusieurs fois on s'aperçoit que la teneur en oxygène limite capable de lever l'inhibition du mouvement des stomates se situe entre 5.10^{-5} et 3.10^{-4} pour le mouvement d'ouverture et 5.10^{-5} à 1.10^{-4} pour la fermeture.

Lorsque pour une feuille l'inhibition du mouvement d'ouverture est levée avec une teneur en oxygène déterminée l'inhibition de la fermeture l'est également.

La réciproque n'est pas toujours vraie, car si la fermeture est possible pour une certaine teneur limite en oxygène, l'ouverture ne l'est pas toujours dans les mêmes conditions.

Si l'on choisi comme teneur en oxygène limite celle pour laquelle la levée d'inhibition du mouvement des stomates est observée dans 50% des cas environ cette teneur se situe entre 1 et 2.10^{-4} pour l'ouverture entre 5.10^{-5} et 1.10^{-4} pour la fermeture dans nos conditions expérimentales.

12-3. Influence des pressions partielles d'oxygène sur la vitesse du mouvement des stomates.

Les expériences se déroulent en conditions isothermes à 20°C. Dans notre étude précédente concernant l'effet de la température sur la vitesse du mouvement des stomates, nous avons montré qu'à 20°C dans l'air, la moyenne des vitesses pour l'ouverture était de $\overline{\Delta\Pi_1}$ = 0,316 cm.h^{-1} et pour la fermeture - $\overline{\Delta\Pi_1}$ = 0,360 cm.h^{-1}. Le rapport vitesse d'ouverture / vitesse de fermeture valant 0,9. Dans cette étude nous avons choisi quelques pressions partielles d'oxygène et pour chaque teneur nous avons calculé la moyenne des vitesses d'ouverture et de fermeture. Enfin nous avons fait une analyse statistique pour les pressions partielles d'oxygène 0,03% et 0,25%. La gamme des teneurs étudiées, s'étend de 0 à 0,25% d'oxygène dans l'azote.

123-1. Protocole expérimental.

Les stomates étant fermés à l'obscurité en air sec contenant 0,03% de gaz carbonique on remplace l'air par le mélange azote-oxygène étudié avec la même teneur en gaz carbonique. Les stomates restent fermés. Après une demi-heure, l'équilibre entre la teneur en oxygène du mélange et celle des cellules est établi. On supprime alors le gaz carbonique du mélange ; cette opération constitue le temps 0 du traitement d'ouverture. On mesure l'accroissement de Π après une heure ($\Delta\Pi_1$) on laisse les stomates atteindre leur maximum d'ouverture puis lorsque le degré d'ouverture s'est stabilisé on fournit à nouveau le gaz carbonique de teneur 0,03% c'est le début du traitement de fermeture, on mesure suivant les cas $-\Delta\Pi_{1/2}$ ou $-\Delta\Pi_1$ et on ramène les mesures à une heure de toute façon.

Fig. 47. Courbes représentatives des vitesses moyennes d'ouverture ($\overline{\Delta\Pi_1}$) et de fermeture ($-\overline{\Delta\Pi_1}$) en fonction de la pression partielle d'oxygène. L'intervalle de confiance de la moyenne à p0,05 des vitesses d'ouverture ↕ et de la moyenne des vitesses de fermeture ↕ a été calculé pour les pressions partielles d'oxygène 0,03%, 0,25% et 20,9%(air).

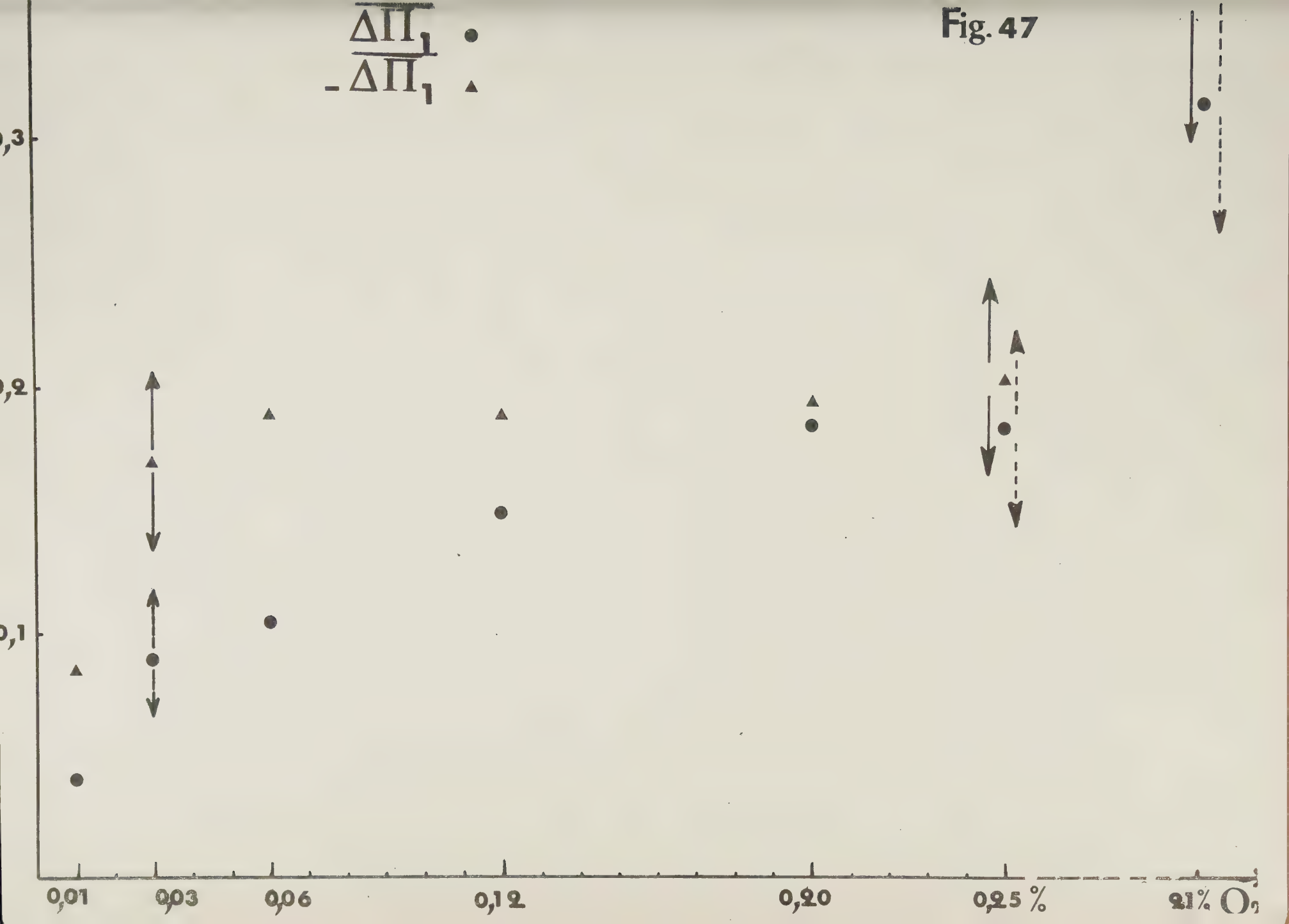


Fig. 47

123-2. Résultats.

1232-1. Moyenne des vitesses d'ouverture ($\overline{\Delta\Pi_1}$), de fermeture ($-\overline{\Delta\Pi_1}$), et du rapport

$$R = \frac{\overline{\Delta\Pi_1}}{-\overline{\Delta\Pi_1}}$$ en fonction de pO_2.

Les moyennes des résultats sont consignées dans le tableau VI ; les courbes expérimentales des variations de $\overline{\Delta\Pi_1}$ et $-\overline{\Delta\Pi_1}$ sont représentées fig. 47.

Tableau VI.

Teneur en O_2%	$\overline{\Delta\Pi_1}$ cm h^{-1}	$-\overline{\Delta\Pi_1}$ cm h^{-1}	$R = \overline{\Delta\Pi_1} / -\overline{\Delta\Pi_1}$
21 %	0,316	0,360	0,92
0,25 %	0,185	0,205	0,90
0,20 %	0,184	0,196	0,93
0,12 %	0,150	0,190	0,55
0,06 %	0,105	0,190	0,55
0,03 %	0,09	0,170	0,54
0,01 %	0,04	0,086	0,46

1232-2. Etude des variations de $\overline{\Delta\Pi_1}$ et $-\overline{\Delta\Pi_1}$ pour pO_2 = 21%, 0,25% et 0,03%.

Les résultats sont consignés dans le tableau VII. L'intervalle de confiance de la moyenne est calculé pour p = 0,05.

Tableau VII.

pO_2	$\overline{\Delta\Pi_1}$	$-\overline{\Delta\Pi_1}$
21 %	0,26 < 0,32 < 0,37	0,30 < 0,36 < 0,42
0,25 %	0,16 < 0,19 < 0,22	0,16 < 0,20 < 0,24
0,03 %	0,07 < 0,09 < 0,11	0,13 < 0,17 < 0,21

Les intervalles de confiance se recoupent pour pO_2 = 21 % et 0,25% ; l'application du test t de STUDENT permet de montrer que la différence entre les vitesses d'ouverture et de fermeture respectivement pour chaque pO_2 n'est pas significative. Par contre les intervalles ne se recoupent pas pour pO_2 = 0,03 %, la vitesse d'ouverture est donc statistiquement différente de la vitesse de fermeture.

L'application du test t montre qu'elle est hautement significative : pour p0,01 et 53 degrés de liberté $t_d 0,01 = 2,65$, t_d calculé vaut 3,39.

1232-3. Conclusion.

La vitesse moyenne d'ouverture et de fermeture diminue lorsqu'on abaisse la pression partielle d'oxygène.

L'effet de la diminution des teneurs en oxygène est plus marqué sur les vitesses d'ouverture que sur les vitesses de fermeture.

Une valeur intéressante pour la suite de la discussion est celle de la pression partielle d'oxygène pour laquelle la vitesse d'ouverture maximale est diminuée de moitié. Celle-ci se situe vers 0,12 % d'oxygène.

12-4. Influence des pressions partielles d'oxygène sur l'intensité respiratoire.

124-1. Méthode d'étude.

Des plants de Pelargonium illuminés sont placés à l'obscurité pendant une heure environ dans une atmosphère enrichie en vapeur d'eau.

Des feuilles adultes sont alors prélevées, la section du pétiole se faisant au ras du limbe. Les feuilles pesées sont introduites dans les grandes fioles (120 ml) d'un respiromètre de Warburg.

Après la mise en équilibre thermique on laisse les feuilles respirer une heure environ avant de commencer les mesures proprement dites. Ce délai permet d'obtenir une intensité respiratoire aussi stable que possible, selon les observations de CARLIER (1964). Lorsque l'intensité respiratoire dans l'air est mesurée pour chaque feuille, on remplace l'air par un mélange azote-oxygène adéquat ; puis, après une nouvelle période destinée à obtenir

un régime stable, on mesure l'intensité respiratoire de chaque feuille que l'on peut donc comparer à la valeur obtenue dans l'air.

124-2. Résultats.

Une valeur intéressante est celle pour laquelle l'intensité respiratoire est diminuée de moitié, ce qui permet de caractériser globalement l'affinité pour l'oxygène. Cette teneur est voisine des valeurs classiquement obtenues pour divers organes végétaux et se situe vers 1,5% d'oxygène dans l'azote.

Remarquons que le point d'extinction se situe légèrement au-dessus de 3%.

12-5. Discussion.

125-1. Influence de la pression partielle d'oxygène sur la levée d'inhibition du mouvement des stomates en anaérobiose.

La zone des pourcentages d'oxygène limites permettant de lever l'inhibition de l'ouverture chez 50% des feuilles examinées est comprise entre 0,01 et 0,02% environ ; pour la fermeture elle est comprise entre 0,005 et 0,01%. Si l'on suppose que l'oxygène permet la synthèse de l'ATP par la phosphorylation oxydative, il semble que le mouvement d'ouverture ait un besoin en énergie supérieur à celui de fermeture qui toutefois, dans nos conditions expérimentales n'est jamais nul. Les expériences se déroulant à l'obscurité, l'apport d'oxygène par la photosynthèse n'est pas à craindre. Ce type d'expériences ne peut donc être effectué qu'à l'obscurité.

125-2. Influence de la pression partielle d'oxygène sur la vitesse du mouvement des stomates.

L'étude statistique montre que, pour le mélange azote-oxygène à 0,03% la vitesse d'ouverture est significativement différente de la vitesse de fermeture, ce qui n'est pas le cas pour la teneur 0,25%. Le rapport vitesse d'ouverture / vitesse de fermeture voisin de 0,9 à 20°C dans l'air s'abaisse à une valeur proche de 0,5. Il apparaît nettement que la vitesse d'ouverture est beaucoup plus inhibée que la vitesse de fermeture par l'absence d'oxygène, ce qui confirme les observations préliminaires concernant la levée d'inhibition du mouvement des stomates en anaérobiose. Par conséquent nous pouvons formuler la même hypothèse en ce qui concerne le rôle énergétique de l'oxygène.

125-3. Influence comparée du rôle de la pression partielle d'oxygène sur le mouvement des stomates et sur l'intensité respiratoire .

Il est remarquable de constater que la teneur en oxygène qui réduit de moitié la vitesse du mouvement d'ouverture des stomates (0,12% environ) est dix fois plus faible que celle qui diminue de moitié l'intensité de la respiration. L'interprétation de ce fait est délicate. En effet, nous mesurons l'in-

tensité respiratoire globale de la feuille, mais nous ignorons quelle est l'intensité respiratoire des cellules stomatiques. Nous ne savons pas non plus si toute l'énergie utilisée dans le mouvement des stomates est produite dans la cellule stomatique. En supposant arbitrairement que l'intensité respiratoire des cellules stomatiques est du même ordre de grandeur que celle des cellules du parenchyme, on s'aperçoit que les enzymes impliquées dans le mouvement des stomates ont une grande affinité pour l'oxygène. Est-ce que l'énergie produite lors de la fermentation anaérobie est utilisable ? Il semble que cela ne soit pas le cas du *Pelargonium X hortorum* .

Des recherches récentes SAWHNEY et ZELITCH (1969) semblent montrer que l'ouverture des stomates s'accompagne d'une pénétration de l'ion potassium dont la quantité pourrait expliquer les variations de la pression osmotique observées dans les cellules stomatiques. Or si l'ion potassium pénètre, ou bien il s'agit d'un phénomène passif, et dans ce cas ce n'est pas le moteur principal du mouvement des stomates puisque ceux-ci sont actifs, ou bien la pénétration de l'ion potassium compense une sortie active d'un ion, ou bien il pénètre lui-même activement.

Dans cette hypothèse, STEWARD et SUTCLIFFE (1959) montrent que, dans d'autres tissus végétaux, la quantité d'anions ou de cations (Br^- et K^+) accumulés en fonction de la pression partielle d'oxygène suit étroitement les variations de l'intensité respiratoire. A 23°C l'intensité respiratoire est diminuée de moitié pour une pression partielle d'oxygène voisine de 4%, l'accumulation de l'ion Br^- est réduite de la même manière à 10% d'oxygène. Dans d'autres expériences avec les ions brome et rubidium, l'accumulation est diminuée de moitié pour des pressions partielles de 5% pour le brome et 6 à 7% pour le rubidium. Si la pénétration du K^+ est liée au mouvement des stomates il serait logique de penser que le pourcentage d'oxygène diminuant de moitié la vitesse du mouvement des stomates est voisin de celui qui diminue de moitié l'intensité de la respiration si l'on suppose que les intensités respiratoires de la feuille et des cellules stomatiques sont comparables. Ceci est en contradiction avec nos expériences.

Nous devons rappeler cependant que la pénétration de l'ion K^+ est observée à la lumière et que certains auteurs dont ZELITCH (1969) pensent que les mouvements d'ouverture et de fermeture observés à l'obscurité en fonction de la teneur en gaz carbonique seraient différents. La question reste actuellement sans réponse.

Conclusions.

Les mouvements des stomates de *Pelargonium X hortorum* provoqués par les variations de la teneur en gaz carbonique de l'air à l'obscurité sont de type "actif" c'est-à-dire exigent de l'oxygène. La diminution de la pression partielle d'oxygène au niveau des feuilles inhibe plus fortement le mouvement d'ouverture que celui de fermeture. Ceci implique à notre sens que les mécanismes biochimiques aboutissant à l'ouverture sont différents de ceux permettant la fermeture. Les expériences décrites ci-dessus apportent un second support expérimental à l'hypothèse de deux mécanismes différents pour l'ouverture et la fermeture déjà formulée de manière théorique par LEVITT (1967). Puisque nous avons montré la nature"active" des mouvements des stomates provoqués par les variations de la concentration en gaz carbonique à l'obscurité, il était donc intéressant, afin de bien préciser ces notions, d'étudier si des types de mouvements reconnus classiquement comme "passifs"

le sont bien en réalité. C'est à propos de cette étude que nous avons abordé un problème déjà ancien concernant les mouvements des stomates, à savoir les effets de la section du pétiole des feuilles sur l'intensité de la transpiration et les mouvements des stomates. L'interprétation des faits a fait l'objet d'une controverse ardente jusqu'à ces dernières années. Nous pensons que l'étude entreprise sur le Pelargonium a permis de régler en partie ce problème.

2- EFFETS DES CONDITIONS D'OXYDATION SUR LE MOUVEMENT DES STOMATES PROVOQUE PAR LA SECTION DU PETIOLE DES FEUILLES.

Depuis le début du siècle, de nombreuses observations ont été publiées concernant l'influence de la section du pétiole des feuilles sur le mouvement des stomates, la transpiration et l'intensité de la photosynthèse apparente. Les recherches ont concerné soit l'un ou l'autre des phénomènes soit les trois à la fois. Une brève revue de la littérature en particulier des publications de DARWIN et PERTZ (1911), LAIDLAW et KNIGHT (1916), IWANOFF (1928), STÅLFELT (1929), SCARTH et SHAW (1951), MILTHORPE et SPENCER (1957), ALLERUP (1959-1960) DECKER et WIEN (1960), BRUN (1961-1965), RUFELT (1963 a), FRANCO, COARACY et MAGALHAES et CELSO (1963), WILLIS, YEMM et BALASUBRAMANIAM (1963), MEIDNER (1965), montre l'intérêt de cette question ainsi que les controverses qu'elle a provoquées HEATH (1963), MEIDNER et HEATH (1963), RUFELT (1963 b-c). Ces auteurs ont montré qu'en aérobiose, en présence de lumière, la section du pétiole entraîne des variations importantes de l'ouverture des stomates qui sont le plus souvent accompagnées de modifications de la transpiration et de la photosynthèse apparente. Deux sortes de problèmes sont évoqués par les auteurs : d'une part les causes des mouvements des stomates observés, et d'autre part les relations entre ces divers phénomènes. Dans ce travail nous examinerons le premier problème uniquement.

DARWIN et PERTZ (1911) qui observèrent les premiers l'ouverture temporaire des stomates consécutive à la section du pétiole ont émis l'hypothèse suivante : la feuille subissant une intense déshydratation, les cellules épidermiques adjacentes aux cellules stomatiques perdraient leur eau beaucoup plus rapidement que ces dernières ; la pression de turgescence exercée contre les cellules stomatiques diminuerait donc et, dans un premier temps, les stomates s'ouvriraient passivement ; les cellules stomatiques perdant de l'eau à leur tour, les stomates se fermeraient dans un second temps. Cette ouverture temporaire expliquerait l'augmentation de transpiration mesurée simultanément, si l'on admet que les stomates limitent les échanges de vapeur d'eau par diffusion entre la feuille et l'atmosphère. IWANOFF (1928) a émis une hypothèse très différente pour expliquer l'augmentation de transpiration. Pour cet auteur, la séparation de la plante mère entraîne une chute brutale des tensions existant dans les colonnes d'eau du système vasculaire ; en conséquence, l'eau deviendrait plus "disponible" pour les cellules et cette hyperhydratation des cellules entraînerait une augmentation de la transpiration.

Depuis ces premières explications, divers auteurs ont apporté des arguments en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses. Dans ce travail nous nous sommes attachés à montrer la part qui revient à l'une et à l'autre dans l'explication du mouvement des stomates. Une étude en anaérobiose va nous permettre de préciser les différents effets de l'eau sur le mouvement des stomates.

Fig. 48. Influence de la section du pétiole maintenu émergé (SPE) lorsque la feuille (F) est balayée par de l'air humide.

ah - CO_2 = air humide dépourvu de gaz carbonique

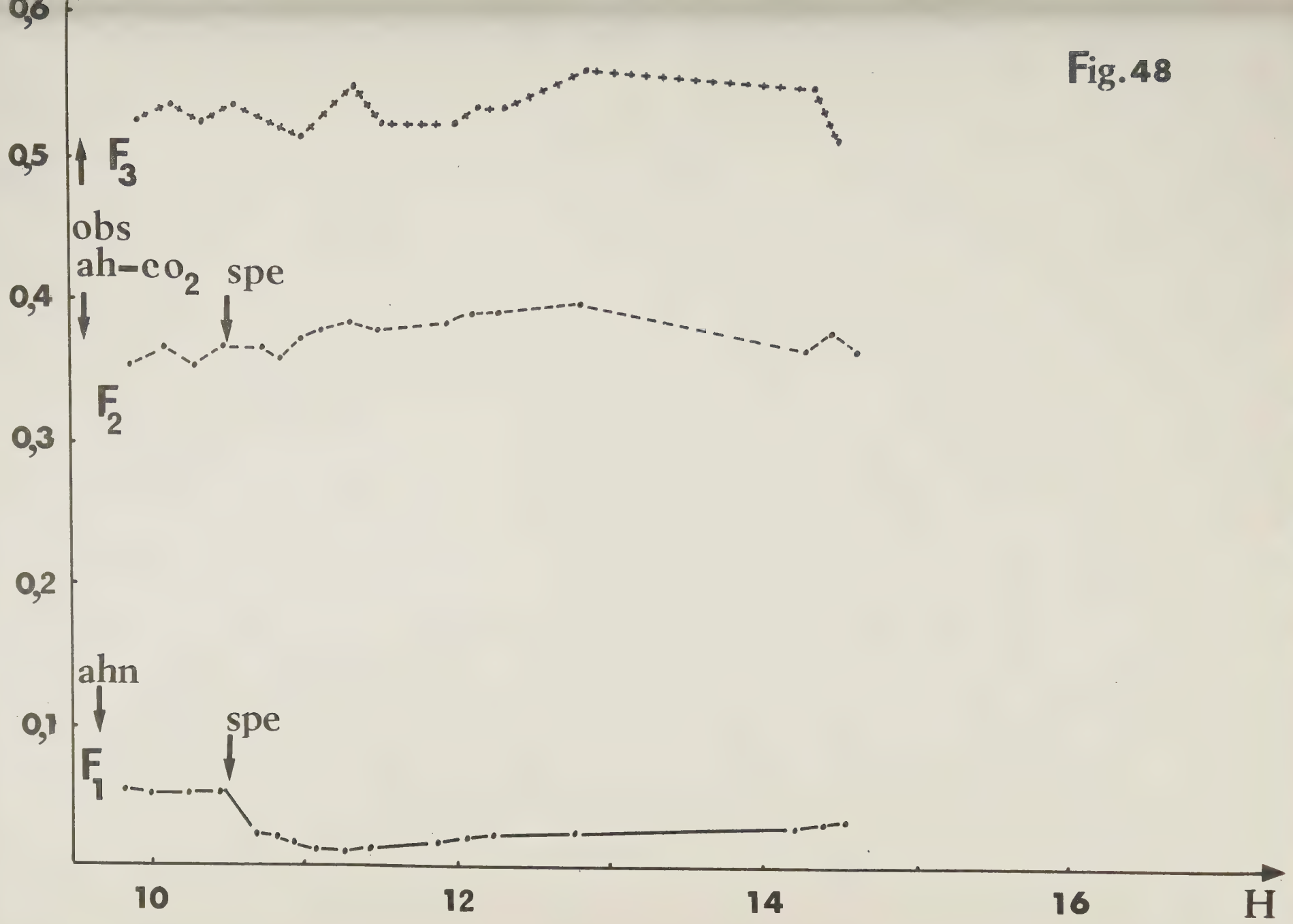
ahn = air humide normal.

Fig. 49. Influence de la section du pétiole immédiatement immergé (SPI) lorsque la feuille est balayée par de l'air sec.

SPI H_2O = pétiole immergé dans l'eau.

PI man. = remplacement de l'eau par une solution saturée de mannitol

Fig. 48



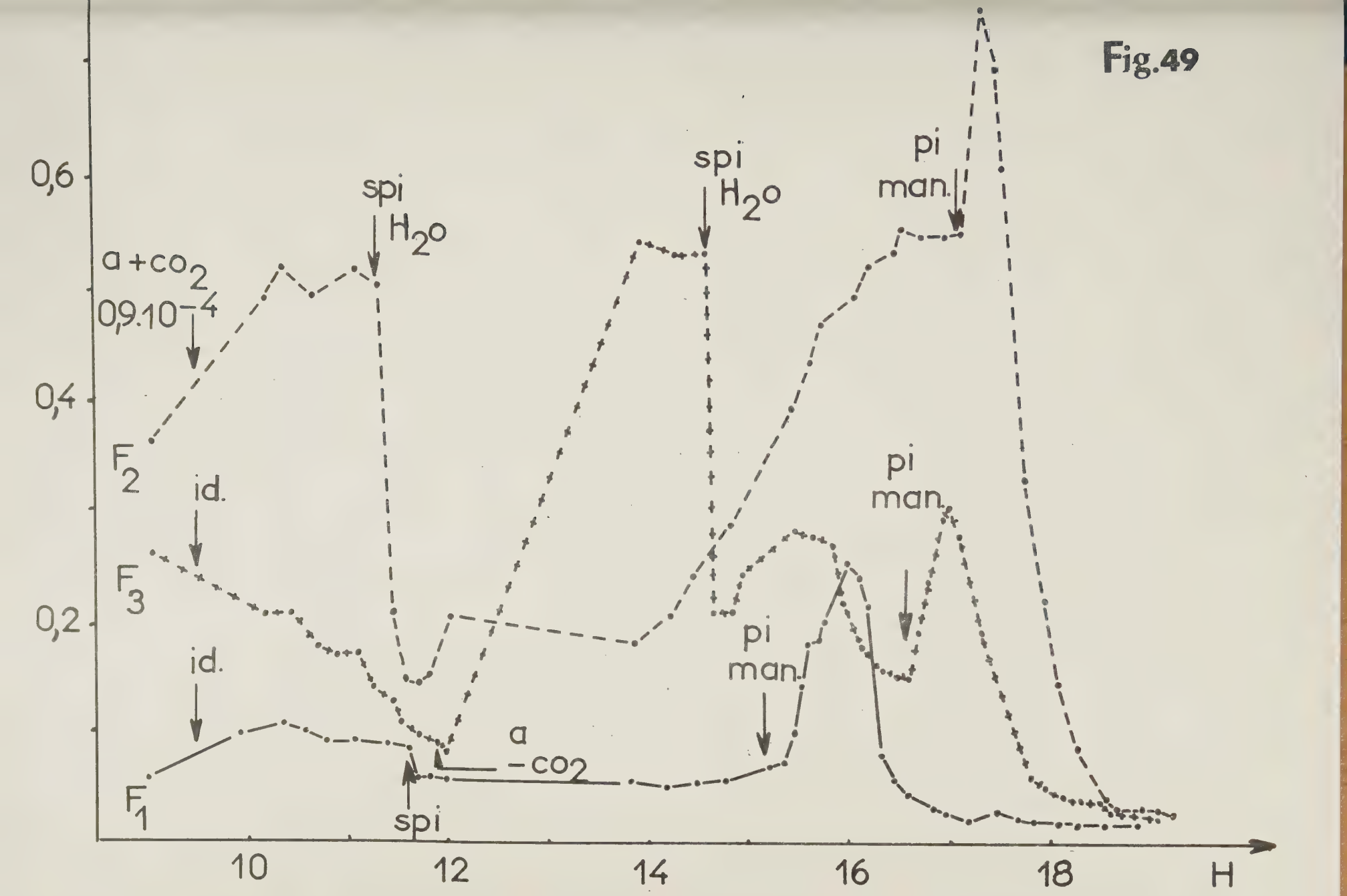


Fig.49
0,6
0,4
0,2
spi
H2o
spi
H2o
pi
man.
a+co2
0,9.10-4
F2
id.
F3
pi
man.
pi
man.
id.
a
-co2
F1
spi
10
12
14
16
18
H

2-1. Influence de la section du pétiole sur le mouvement des stomates à l'obscurité, en aérobiose.

21-1. Après section, le pétiole est maintenu émergé (SPE).

211-1. En air sec.

A l'obscurité, nous observons le phénomène classique décrit par les auteurs à la lumière : les stomates s'ouvrent temporairement puis se ferment. Toutefois lorsque les stomates sont initialement trop peu ouverts (Π <0,05cm) l'ouverture temporaire n'a pas lieu. En air dépourvu de gaz carbonique la fermeture est ralentie ; une série d'expériences montre que le mouvement d'ouverture temporaire est d'autant plus important que le degré d'ouverture est plus élevé, jusqu'à une valeur limite de Π de l'ordre de 0,5 à 0,6 cm.

211-2. En air saturé de vapeur d'eau.

La section pratiquée en air humide, à l'obscurité (fig. 48), n'entraîne aucune variation d'ouverture pour la feuille F_2 dont les stomates sont ouverts en air dépourvu de gaz carbonique ; F_3 maintenue dans les mêmes conditions sert de témoin. Pour F_1, maintenue en air normal humidifié, on observe une légère fermeture et un retour progressif au degré d'ouverture initial.

211-3. Conclusions.

La section du pétiole entraîne une ouverture temporaire des stomates à condition que l'air soit sec et que les stomates soient initialement déjà entre-ouverts. Ces conditions impliquent donc la nécessité d'une transpiration importante afin que la feuille subisse une intense déshydratation.

21-2. Après section, le pétiole est aussitôt immergé (SPI).

212-1. On fournit à la feuille de l'eau pure.

La figure 49 montre qu'à l'obscurité chez le Pelargonium la section est suivie d'une fermeture rapide (10mn) puis d'une réouverture lente dans le cas de la feuille F_2 ; F_1 dont les stomates sont peu ouverts marque une légère fermeture. Dans le cas de F_3, les stomates étant trop fermés, on fournit de l'air dépourvu de gaz carbonique ce qui permet d'obtenir un degré d'ouverture supérieur ; si l'on pratique alors la section on observe la même réponse que pour F_2.

212-2. On fournit à la feuille une solution saturée en mannitol.

Lorsque le degré d'ouverture des stomates s'est stabilisé à nouveau l'eau est remplacée par une solution aqueuse saturée en mannitol. On observe dans les trois cas une ouverture temporaire précédent une fermeture complète. (La valeur Π =0 correspondant à des stomates complètement fermés n'est obtenue que rarement mais elle est possible).

Fig. 50. Influence de la section du pétiole immergé dans une solution saturée de mannitol lorsque la feuille est balayée par de l'air sec.

SPI man. = pétiole sectionné et aussitôt immergé dans une solution saturée de mannitol.

Fig. 51. Influence de la section du pétiole maintenu émergé ou immédiatement immergé lorsque la feuille est balayée par de l'azote sec (N_2).

N_2 = azote.

Pe = pétiole émergé.

a = air de même teneur que l'azote en CO_2.

Fig. 52. Rôle du mannitol en azote sec.

man. conc. = solution saturée de mannitol.

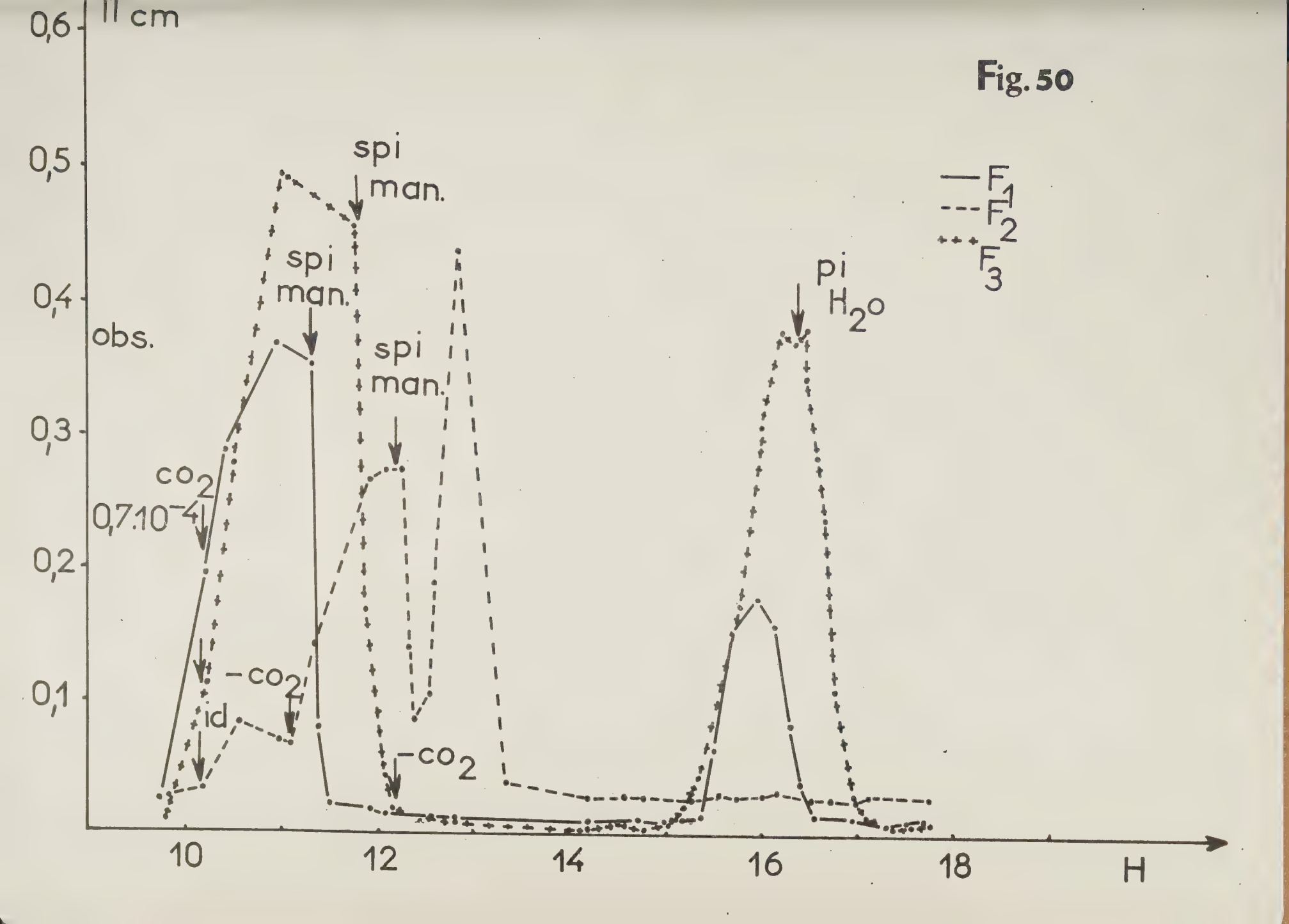


Fig. 50
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
11 cm
obs.
spi man.
spi man.
spi man.
pi H2O
F1
F2
F3
CO2
0,7.10-4
-CO2
id
-CO2
10
12
14
16
18
H

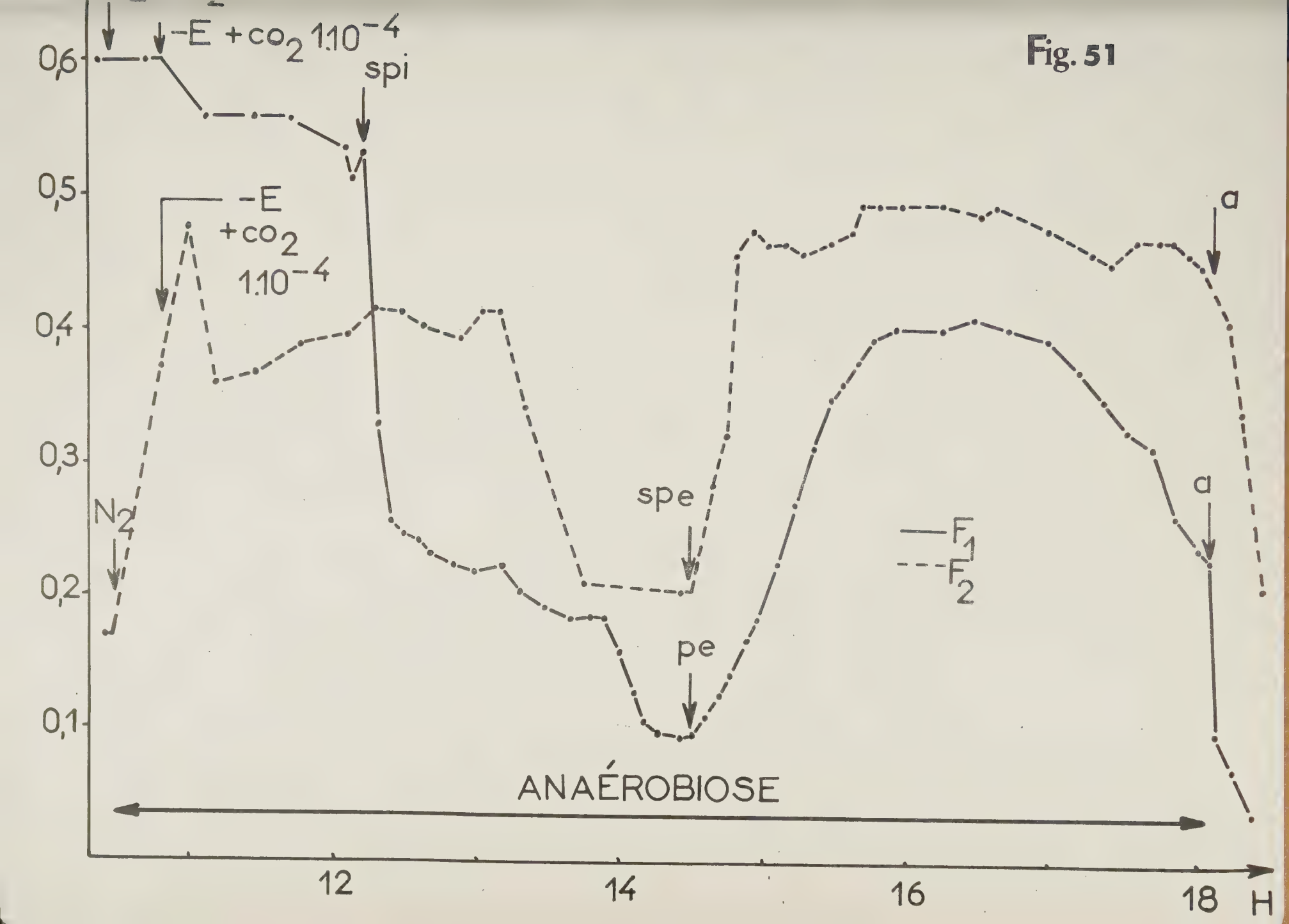

-E +co2 1.10-4
spi
-E
+co2
1.10-4
N2
spe
pe
a
a
F1
F2
ANAÉROBIOSE
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
12
14
16
18
H

Fig. 51

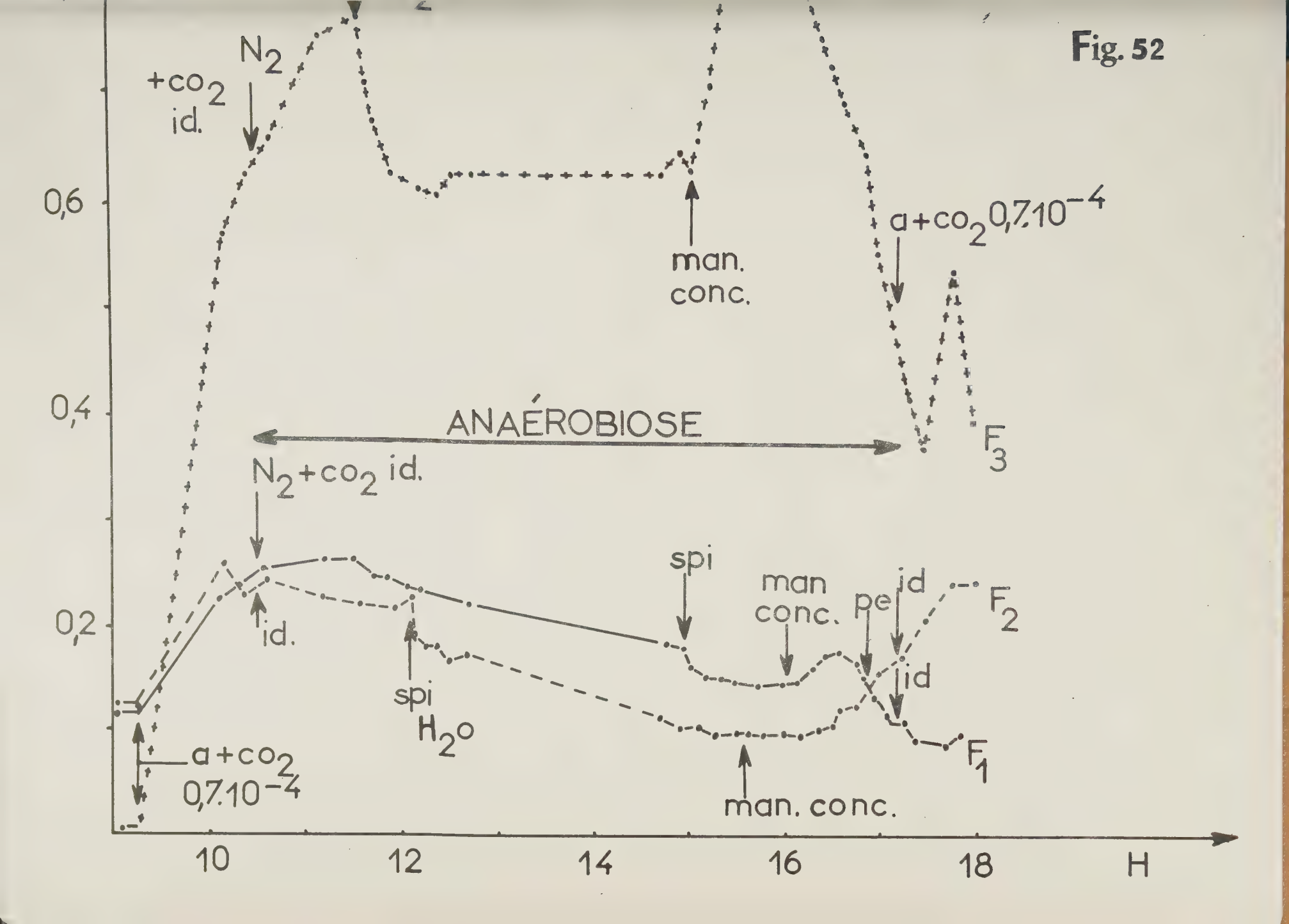


Fig. 52
N_2
$+co_2$ id.
0,6
0,4
0,2
man. conc.
a $+co_2$ $0,7.10^{-4}$
F_3
ANAÉROBIOSE
N_2+co_2 id.
spi
man conc.
pe
id
F_2
id.
spi H_2O
id
F_1
a $+co_2$ $0,7.10^{-4}$
man. conc.
10
12
14
16
18
H

Si on fournit au pétiole immédiatement après la section une solution saturée en mannitol (fig. 50), il doit être possible d'observer la fermeture puis l'ouverture temporaires dissociées dans l'expérience précédente, à condition que les deux mouvements ne soient pas rigoureusement simultanés. La feuille F_2 présente ce phénomène. Pour F_1 et F_3 il est probable que la fermeture a été trop rapide et que les stomates une fois fermés sont dans l'incapacité de se réouvrir dans l'immédiat. Si la réouverture est réamorcée par l'envoi d'air dépourvu de gaz carbonique sur F_1 et F_3 (fig.39-CO_2) après un temps de latence long, le mannitol peut alors entraîner l'ouverture temporaire décrite plus haut. La remise du pétiole de F_3 dans l'eau (PI H_2O) ne modifie pas ce mouvement.

Conclusions.

La section et l'immersion immédiate du pétiole dans l'eau provoquent une fermeture temporaire suivie d'une réouverture.

La déshydratation de la feuille provoquée par l'apport de mannitol entraîne les mêmes réactions des stomates que celles décrites dans le paragraphe 211-1.

2-2. Influence de la section du pétiole sur le mouvement des stomates à l'obscurité, en anaérobiose.

22-1. Le pétiole des feuilles balayées par de l'azote sec est maintenu émergé ou immédiatement immergé (SPE ou SPI).

Dans l'expérience décrite fig. 51 nous inhibons le mouvement des stomates par balayage avec de l'azote lorsque nous avons obtenu un degré d'ouverture élevé. La feuille F_1 est sectionnée et son pétiole est immergé dans l'eau immédiatement (SPI). *On observe une fermeture brutale mais pas de réouverture.* Si on pratique SPE sur F_2 en azote sec, on observe une *ouverture temporaire importante mais pas de fermeture.* Sur cette feuille, les stomates se maintiennent ouverts pendant au moins trois heures malgré une déshydratation intense. Toutefois et au bout de temps variables suivant la taille de la feuille, on finit à la longue par obtenir une fermeture mais seulement lorsque la feuille donne des signes de fanaison. Si l'on supprime la fourniture d'eau à F_1 (pe), on observe l'ouverture des stomates, mais là encore, le mouvement de fermeture est considérablement ralenti. Il suffit de balayer les deux feuilles par l'air normal (a) pour observer la fermeture immédiate. Les résultats précédents sont confirmés dans l'expérience décrite fig. 52. Nous remarquons que le mouvement de fermeture consécutif à SPI est très atténué lorsque les stomates sont peu ouverts (F_1 et F_2). Si l'on fournit une solution saturée en mannitol (man. conc.) on observe un mouvement d'ouverture temporaire suivi du mouvement de fermeture. Pour la feuille F_3 dont le niveau d'ouverture est plus élevé, le retour dans l'air provoque une petite augmentation temporaire de l'ouverture des stomates.

Fig. 53. Influence de la section du pétiole maintenu émergé ou immédiatement immergé lorsque la feuille est balayée par de l'azote humidifié (h) : rôle du passage en azote sec (N_2 s).

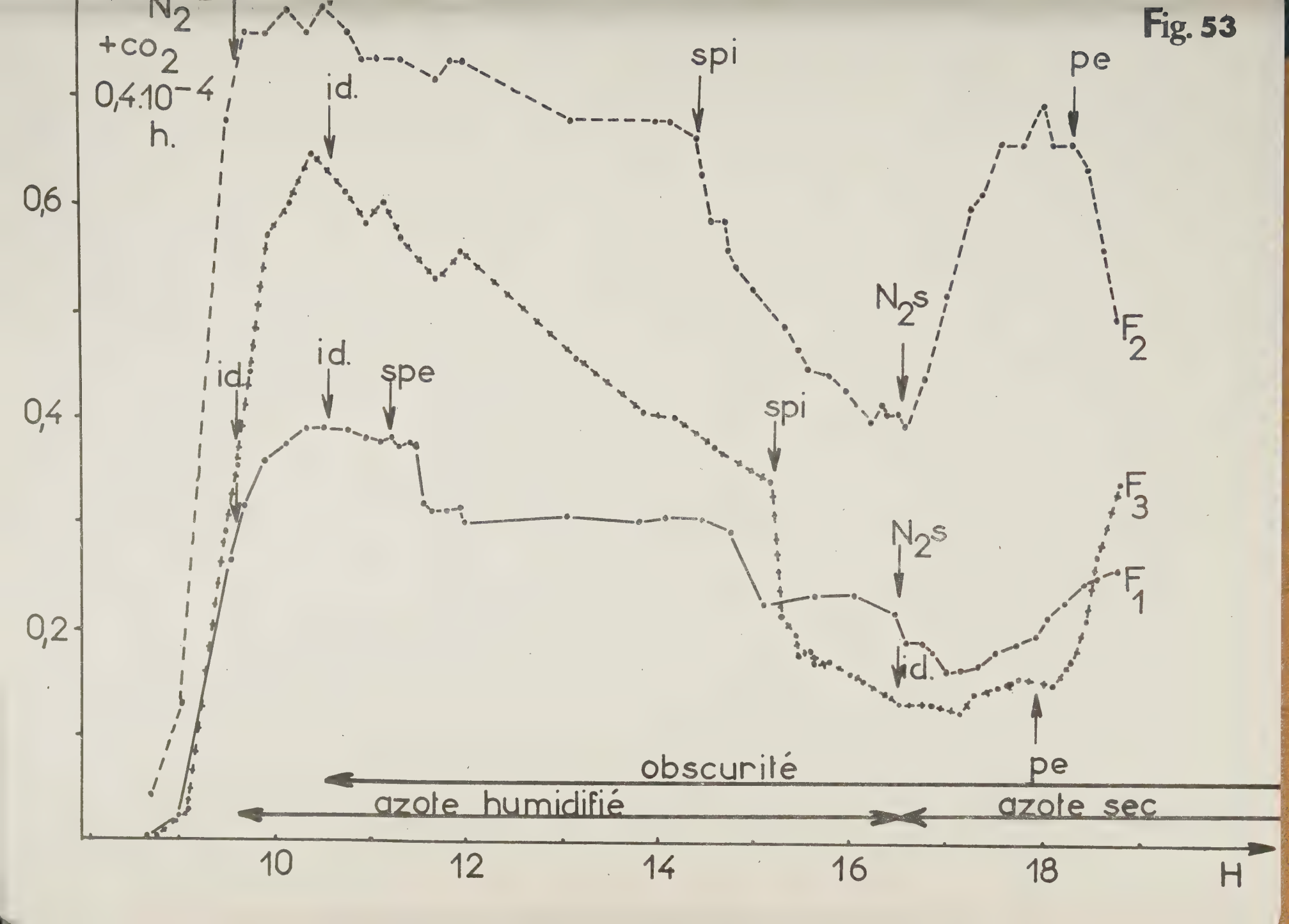


Fig. 53
N_2
$+CO_2$
$0,4.10^{-4}$
h.
id.
spi
pe
0,6
0,4
0,2
id.
id.
spe
spi
N_2s
F_2
F_3
F_1
N_2s
id.
pe
obscurité
azote humidifié
azote sec
10
12
14
16
18
H

22-2. Le pétiole des feuilles balayées par de l'azote humidifié est maintenu émergé ou immédiatement immergé.

Lorsque le pétiole est maintenu émergé on observe un léger mouvement de fermeture (fig. 53,F_1). Parfois on observe aucun mouvement particulier, ce qui rappelle l'expérience conduite en air humide (fig. 48,F_2). Enfin il est possible d'obtenir assez rarement une très faible ouverture (non figurée). Lorsque le pétiole est immédiatement immergé, on observe comme en azote sec une fermeture temporaire (fig. 53, F_2 et F_3). Le passage de l'azote humidifié à l'azote sec entraîne pour la feuille F_2 dont les stomates sont bien ouverts une ouverture temporaire. La feuille F_3 dont les stomates sont peu ouverts ne réagit pas au passage dans l'azote sec, il faut retirer le pétiole de l'eau pour obtenir l'ouverture temporaire.

Conclusion.

En anaérobiose comme en aérobiose on observe les mouvements d'ouverture temporaires consécutifs à une déshydratation intense des feuilles ; par contre le mouvement de fermeture immédiat observé postérieurement en aérobiose est très retardé en l'absence d'oxygène.

Le mouvement de *fermeture temporaire* consécutif à l'immersion du pétiole dans l'eau est *observé avec ou sans oxygène*. La réouverture parfois observée en aérobiose (fig. 49, F_2) ne l'est jamais en anaérobiose. L'ouverture temporaire suivie de la fermeture induites par le mannitol ont lieu en aérobiose et en anaérobiose.

2-3. Discussion.

Ces diverses expériences permettent à notre sens d'unifier les résultats et les interprétations contradictoires observés dans la littérature. Elles montrent que, suivant les conditions de balayage des feuilles et le degré d'ouverture des stomates, les réponses sont différentes.

23-1. Interprétation des expériences de section en aérobiose.

231-1. Le pétiole est maintenu émergé.

A la lumière, de nombreux auteurs, STÅLFELT (1929), MILTHORPE et SPENCER (1957), BRUN (1961), WILLIS et al.(1963) observent une ouverture temporaire des stomates suivie d'une fermeture. Nous observons le même phénomène à l'obscurité à condition que les stomates ne soient pas trop fermés. SCARTH et SHAW (1951) ont montré toutefois que la fermeture consécutive est retardée en air dépourvu de gaz carbonique, ce que nous confirmons à l'obscurité. Essayons d'expliquer les faits à l'aide des hypothèses avancées précédemment. L'hypothèse de DARWIN et PERTZ (1911) est plausible ; en effet, si les cellules épidermiques se déshydratent plus rapidement que les cellules stomatiques, la pression de turgescence exercée contre ces dernières diminue fortement dans un premier temps et les stomates s'ouvrent passivement. Cette hypothèse

est également étayée par la nécessité d'une intense transpiration : l'ouverture temporaire n'est pas observée en air saturé de vapeur d'eau (fig. 48) ni lorsque les stomates sont très peu ouverts. Ensuite, les stomates se ferment, ce qui est normal si les cellules stomatiques perdent de l'eau à leur tour. On pourrait penser qu'il s'agit d'une fermeture passive par simple départ d'eau ; or nous avons vu que l'air dépourvu de gaz carbonique retarde fortement la fermeture. D'autre part, HEATH et MEIDNER (1961) ont mis en évidence des variations importantes de la concentration minimale en gaz carbonique des espaces intercellulaires (Γ) sous l'effet de solutions aqueuses de mannitol. Le mouvement de fermeture pourrait donc être "actif", c'est-à-dire provoqué par l'augmentation de la teneur en gaz carbonique de l'air en présence d'oxygène (cf. p.73).

Dans l'hypothèse d'IWANOFF (1928) l'eau deviendrait plus disponible pour les cellules, deux éventualités sont à considérer :

1er cas : Si les cellules stomatiques "s'hyperhydratent" avant les cellules épidermiques compagnes, on devrait obtenir une ouverture des stomates ce que l'on observe effectivement ; mais la section en air humide devrait être suivie également d'une ouverture temporaire ce qui n'est pas le cas.

2ème cas : Si les cellules stomatiques s'hyperhydratent après les cellules épidermiques, dans un premier temps ces dernières augmentent leur turgescence et on devrait observer une fermeture temporaire passive des stomates ; or c'est l'ouverture qui est observée.

Un début de solution vient de l'examen des effets de la section du pétiole immédiatement immergé.

231-2. Le pétiole est immédiatement immergé.

Dans ce cas on observe une fermeture rapide temporaire suivie d'une réouverture. Puisque la feuille est alimentée en eau il ne doit pas apparaître de déficit hydrique. La seule hypothèse possible est celle d'IWANOFF (2ème cas). Puisqu'en air humidifié on obtient le même résultat, ce mouvement de *fermeture temporaire serait passif*, le mouvement de réouverture pourrait être ou passif ou actif. En effet, bien qu'*à priori* il soit légitime de penser que l'on doive retourner au degré d'ouverture initial par entrée passive d'eau dans les cellules stomatiques, les expériences de CARLIER (1964) ont montré sur ce même matériel végétal que cette expérience provoque une crise respiratoire et l'émission d'une quantité importante de gaz carbonique. Peut-être celle-ci même expliquerait-elle le mouvement de fermeture temporaire ?

A la lumière, dans des conditions toutefois différentes, MILTHORPE et SPENCER (1957) observent une fermeture des stomates et ALLERUP (1959) DECKER et WIEN (1960), WILLIS et al. (1963) une diminution de l'intensité de la transpiration.

Nos expériences nous conduisent à admettre l'hypothèse de DARWIN et PERTZ quand le pétiole est émergé, et celle d'IWANOFF lorsqu'il est immédiatement immergé. Nous expliquons donc les contradictions de la littérature.

Le seul moyen pour trouver une issue à ce problème est d'admettre que les deux phénomènes interviennent *simultanément* mais, lorsque la *déshydratation est intense*, le mécanisme lié à l'hypothèse de DARWIN et PERTZ *l'emporte en intensité sur le second.*

Afin de vérifier notre hypothèse, il apparaît que le seul moyen possible est de pouvoir distinguer les mouvements actifs des mouvements passifs. Nous avons montré que les mouvements "actifs" des stomates de *Pelargonium X hortorum* liés aux variations de la teneur en gaz carbonique étaient inhibés à l'obscurité en l'absence d'oxygène ; nous appellerons "passifs" ceux qui ne le sont pas.

23-2. Interprétation des expériences de section en anaérobiose

232-1. Le pétiole est maintenu émergé (fig. 51).

Sur F_2 on observe une ouverture temporaire mais la fermeture est très retardée. Le *mouvement d'ouverture est donc passif*, ce qui est en faveur de l'hypothèse de DARWIN et PERTZ, mais le *mouvement de fermeture serait de type actif*. Ce n'est qu'après un temps souvent très long que les stomates finiront par se fermer. D'ailleurs l'envoi d'air provoque aussitôt la fermeture. Si l'on retire le pétiole de l'eau (pe. fig 51. F_1) on observe le même phénomène.

232-2. Le pétiole est immédiatement immergé.

On observe une fermeture temporaire, mais la réouverture n'a pas lieu le mouvement de fermeture est donc *passif* , le mouvement de réouverture *actif*.

Afin de démontrer l'intervention des deux mécanismes simultanément, nous avons pratiqué la section du pétiole maintenu émergé en azote saturé de vapeur d'eau. Or les résultats sont variables, légère fermeture, rien ou légère ouverture. Ces résultats s'interprètent aisément si on se souvient qu'une atmosphère est difficilement complètement saturée et qu'il existe toujours une légère transpiration. Dans ces conditions, les effets des perturbations hydriques dans l'hypothèse d'IWANOFF seraient légèrement supérieurs, égaux ou inférieurs à ceux attendus dans l'hypothèse de DARWIN et PERTZ ; cela dépend entre autre du degré d'ouverture des stomates. Ainsi, lorsque les stomates sont peu ouverts, F_1-fig. 48 en air et F_1-fig. 53 en azote humide) la transpiration est faible et c'est le mécanisme d'IWANOFF qui l'emporte.

23-3. Rôle du mannitol.

233-1. En aérobiose

Les expériences avec le mannitol ont permis de montrer que la déshydratation intense est à l'origine de l'ouverture temporaire suivie de la

fermeture. Elles confirment celles de HEATH et MEIDNER (1961) réalisées à la lumière. Il est donc intéressant de faire intervenir simultanément la déshydratation et la section du pétiole immédiatement immergé. La figure 50 montre que l'on peut dissocier les deux phénomènes. La feuille F_2 présente d'abord la fermeture temporaire qui est ici le phénomène le plus rapide, puis l'ouverture temporaire.

233-2. En anaérobiose.

Le mannitol provoque les mouvements d'ouverture et de fermeture comme en aérobiose. *La réaction de fermeture des stomates présente donc dans ce cas une différence importante avec la fermeture très retardée, observée lorsque le pétiole de la feuille est maintenu émergé en anaérobiose.* Or les échanges d'eau dûs aux différences de pression osmotique sont passifs ; cela confirme à notre sens l'hypothèse selon laquelle le mouvement de fermeture des stomates observé lorsque le pétiole est maintenu émergé est de type actif, pendant les premières heures de la déshydratation au moins.

Conclusions.

Le mouvement d'ouverture temporaire observé lorsque le pétiole est maintenu émergé (SPE) est un mouvement passif (turgor passive de STÅLFELT, 1966). Le mouvement de fermeture temporaire lorsque le pétiole est aussitôt immergé (SPI) est passif. Le mouvement des stomates serait donc indépendant de l'augmentation de la teneur en gaz carbonique concommitante signalée par CARLIER (1964) qui montre qu'à l'obscurité SPI est suivie d'une émission de gaz carbonique. Or le mouvement des stomates étant passif, il ne semble pas que celui-ci soit dû aux variations de teneur en gaz carbonique mais que, au contraire, les émissions et les absorptions de gaz carbonique ainsi que le mouvement des stomates ont un dénominateur commun qui est la variation importante de l'intensité des échanges d'eau de la feuille soit avec l'atmosphère (transpiration) soit avec la plante (alimentation en eau).

Les mouvements d'ouverture temporaire et de fermeture stomatiques provoqués par l'apport de mannitol concentré sont également passifs bien que les expériences de HEATH et MEIDNER aient montré qu'ils sont accompagnés respectivement d'une absorption et d'une émission de gaz carbonique (à la lumière).

Les mouvements plus lents de fermeture et de réouverture consécutifs seraient "actifs" ; peut-être pourrait-on dire "scoto-actif" si ce terme n'était pas appliqué par LEVITT (1967) à un autre phénomène. Cela signifie pour nous que ces mouvements exigent de l'oxygène.

L'explication du mouvement des stomates lorsque le pétiole est maintenu émergé a été la plus controversée dans la littérature ; elle implique non pas l'une ou l'autre des hypothèses déjà mentionnées mais les deux, un type de mouvement l'emportant sur l'autre suivant les conditions expérimentales et le degré d'ouverture des stomates.

Cette série d'expériences montre la complexité des mécanismes mis en jeu dans le mouvement des stomates. Nous pensons que seule une étude à l'obs-

curité avec ou sans oxygène permet de séparer les divers types de mouvements, au moins chez le *Pelargonium X hortorum*.

Puisque les mouvements stomatiques liés aux variations de la teneur en gaz carbonique sont "actifs", un ou plusieurs mécanismes biochimiques vont être mis en cause à la fois dans l'ouverture et dans la fermeture des stomates. Afin de rechercher quels types de réactions biochimiques peuvent intervenir dans une séquence métabolique inconnue, de nombreux auteurs ont étudié extensivement l'action de substances inhibitrices sur les diverses réactions enzymatiques connues in vitro. Il était donc intéressant de voir si dans nos conditions expérimentales, l'étude de quelques inhibiteurs pouvait apporter des compléments d'information sur le mécanisme physiologique.

2-4. Influence de quelques inhibiteurs du métabolisme respiratoire sur le mouvement des stomates à l'obscurité.

Le rôle desinhibiteurs dans le mouvement des stomates a été l'objet de nombreux travaux. ZELITCH (1965-1969), MEIDNER et MANSFIELD (1968) en dressent l'inventaire et commentent les différents effets observés. Selon ZELITCH (1969) on peut distinguer les inhibiteurs de la photosynthèse et des phosphorylations de ceux qui agissent sur la membrane cellulaire. MANSFIELD signale un autre type d'inhibiteurs qui agissent sur les mouvements des stomates liés à la teneur en gaz carbonique. Parmi les inhibiteurs de la photosynthèse la dichlorophényl-diméthylurée (DCMU) et la chlorophényl-diméthylurée (CMU) ainsi que les α-hydroxysulfonates empêchent l'ouverture et favorisent la fermeture. L'interprétation de l'action des α-hydroxysulfonates, inhibiteurs de la glycolate-oxydase, est actuellement des plus controversées. ZELITCH (1969) établit un parallélisme étroit entre l'inhibition de l'ouverture stomatique et la synthèse du glycolate à la lumière. Or, à l'obscurité nous avons vérifié (non publié) ainsi que HEATH et collaborateurs (1965) que l'air dépourvu de gaz carbonique peut entraîner une réouverture stomatique en présence d' α-hydroxysulfonate. Ces auteurs concluent que l'inhibition observée n'est que celle de la photosynthèse ce qui entraîne par conséquent une augmentation de la teneur en gaz carbonique des cellules qui fait fermer les stomates. ZELITCH rétorque que le mouvement d'ouverture observé à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique n'est pas un mouvement normal des stomates. Or le mouvement des stomates à l'obscurité est l'objet de notre travail et nous sommes en accord avec HEATH, MEIDNER et MANSFIELD (1965). De même nous éliminons les inhibiteurs qui agissent directement sur la membrane cellulaire tels que les acides alkenylsucciniques ou l'acétate phénylmercurique. Sachant que les mouvements des stomates à l'obscurité sont actifs c'est-à-dire exigent de l'oxygène, nous avons étudié l'action de deux inhibiteurs bien connus de la respiration l'azoture de sodium (N_3Na) et l'iodoacétate de sodium(ICH_2COONa). L'utilisation des inhibiteurs se heurte dans nos expériences à des difficultés très importantes.

24-1. Etude critique de l'emploi des inhibiteurs dans nos propres expériences.

Le plus souvent les auteurs ont utilisé comme matériel des disques de feuilles ou bien des épidermes isolés flottant sur une solution inhibitrice

de concentration déterminée, mais dans nos expériences nous ne pouvons utiliser que des feuilles entières.

241-1. Modes de fourniture de l'inhibiteur.

Deux procédés peuvent être employés pour les feuilles entières, ou bien l'inhibiteur est pulvérisé directement sur la feuille, ou bien il est fourni par le pétiole d'une feuille sectionnée. Le premier procédé semble le meilleur car il amène directement au contact des cellules stomatiques la substance inhibitrice. Encore faut-il qu'elle puisse être absorbée par les cellules ! Nous utilisons une méthode de mesure basée sur la diffusion des gaz à travers la feuille ; or la pulvérisation de substances sur les feuilles risque d'entraîner soit des mouvements passifs par suite de variation de turgescence des cellules épidermiques, soit un bouchage des ostioles modifiant la perméabilité. Il reste donc la technique de fourniture par le pétiole. Lorsque les stomates sont ouverts, une transpiration active a lieu et donc une circulation de solution par l'intermédiaire du système vasculaire. WYLIE (1943) montre que les les cellules épidermiques sont très étroitement en contact avec les petites nervures "minor venation" et qu'elles sont très rapidement atteintes par la solution qui migre dans les vaisseaux, avant même les cellules du parenchyme. Sous réserve d'une transpiration active, il est donc possible de fournir la solution inhibitrice par le pétiole.

241-2. Détermination de la concentration en substance inhibitrice.

Lorsque la méthode des épidermes flottants est utilisée, il est facile de déterminer la concentration en inhibiteur du milieu et de répéter les expériences. Par contre, dans la feuille, le problème est pratiquement insoluble pour plusieurs raisons. La première est l'ignorance de la quantité exacte de la solution absorbée ; on peut certes déterminer l'intensité de la transpiration mais celle-ci varie au cours du temps. Nous avons mesuré la quantité d'eau transpirée par les feuilles de *Pelargonium X hortorum* lorsque les stomates sont ouverts. On peut admettre en moyenne qu'il faut 10 heures environ à une feuille pour transpirer un poids équivalent à son poids frais. Pour obtenir une concentration(X) dans la feuille on fera absorber une solution de concentration 10 X pendant une heure. Mais cette concentration ne sera pas la même dans toute la feuille. Deux observations nous le montrent. Lorsqu'un effet toxique apparaît, ce sont en premier lieu les bords de la feuille qui sont nécrosés, ce qui est logique car la transpiration au niveau des bords entraîne une concentration de la substance qui ne peut plus circuler. D'autre part, nous avons remarqué que la zone de parenchyme entourant le point de départ des nervures dans la feuille de Pelargonium est parfois nécrosée alors que le reste du parenchyme foliaire ne l'est pas. De plus, il est souvent impossible de savoir si la substance inhibitrice pénètre effectivement dans les cellules stomatiques. C'est pourquoi, lorsque nous n'obtenons pas d'inhibition, nous ne pouvons tirer aucune conclusion. Or on sait que les inhibiteurs agissent de manière souvent très différente suivant leur concentration ou suivant le pH du milieu. Toutes ces raisons font que l'étude des inhibiteurs qui présente déjà de sérieuses difficultés *in vivo* sur des épidermes isolés est pratiquement impossible dans nos conditions expérimentales. Cependant, nous avons réussi à confirmer le

Fig. 54. Inhibition de l'ouverture des stomates par l'azoture de sodium.

Fig. 55. Inhibition de la fermeture des stomates par l'azoture de sodium.

Fig. 54

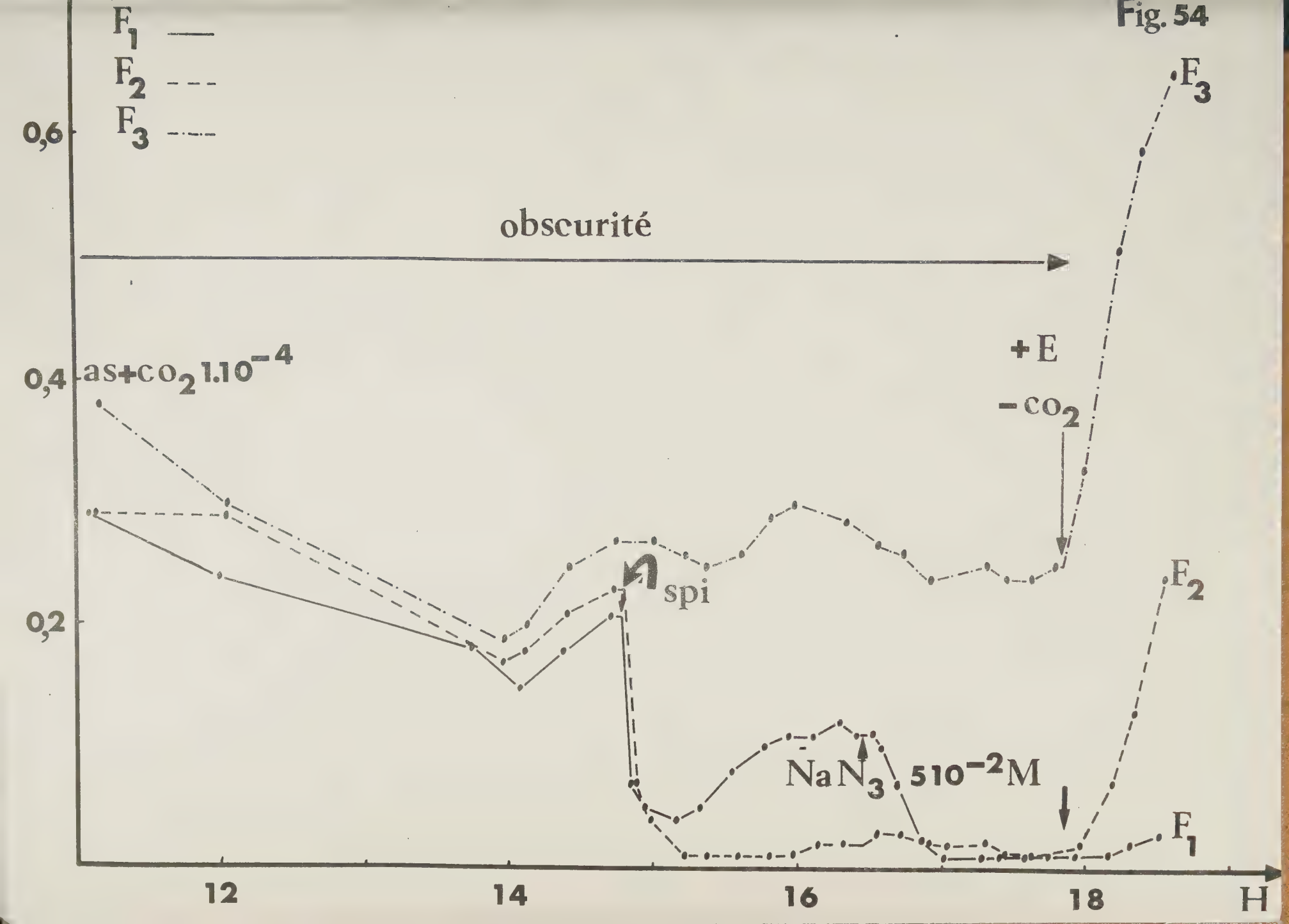
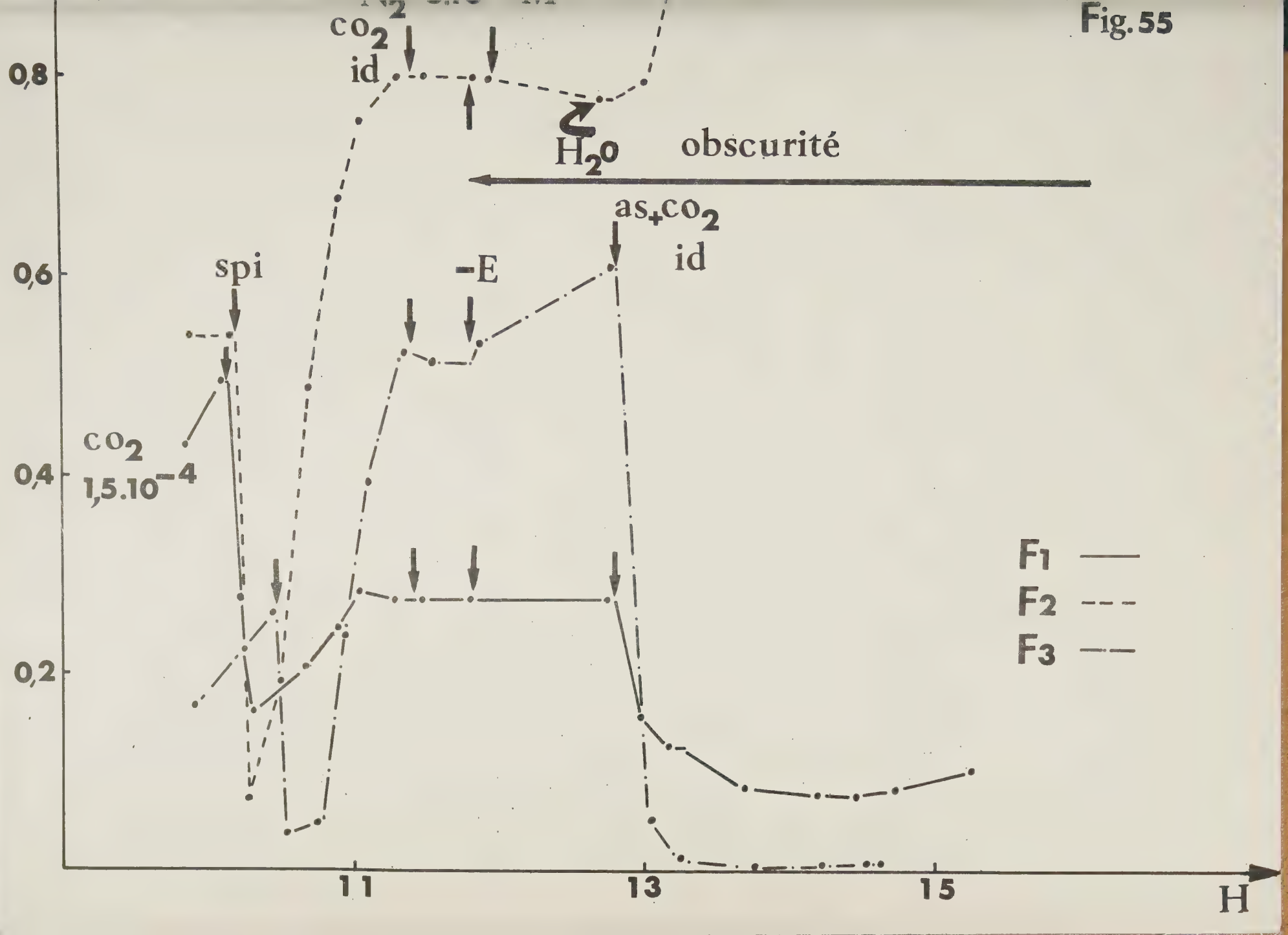

F1
F2
F3
0,6
0,4
0,2
obscurité
as+co2 1.10−4
+E
−co2
spi
F3
F2
F1
NaN3 510−2M
12
14
16
18
H

Fig. 55


0,8
0,6
0,4
0,2
CO_2
id
H_2O
obscurité
spi
-E
as_+CO_2
id
CO_2
$1,5.10^{-4}$
F1
F2
F3
11
13
15
H

rôle de l'azoture de sodium déjà étudié sur des lambeaux d'épiderme, comme substance inhibitrice du mouvement des stomates à l'obscurité, en fonction de la teneur en gaz carbonique de l'air. Nous avons également assayé l'iodo-acétate de sodium.

24-2. Effets de l'azoture de sodium.

MOURAVIEFF (1956) montre que l'azoture inhibe le mouvement d'ouverture des stomates à la lumière et à l'obscurité (1959). STÅLFELT (1957) montre qu'en plus, il inhibe la fermeture des stomates. WALKER et ZELITCH(1963) montrent également que le mouvement d'ouverture à la lumière ainsi que le mouvement de fermeture induit par le passage lumière-obscurité sont inhibés.

242-1. Inhibition du mouvement d'ouverture.

-Conditions de l'expérimentation.

Dans l'expérience décrite figure 54, on fait ouvrir les stomates à l'obscurité le matin avec de l'air de teneur en gaz carbonique 1.10^{-4}. La courbe commence à 13h50 lorsque le degré d'ouverture en équilibre avec cette teneur est atteint. F_1 et F_2 sont sectionnés et le pétiole est immédiatement plongé dans l'eau pure, on observe la fermeture temporaire déjà décrite puis une légère réouverture pour F_1. Lorsque l'équilibre est atteint on remplace l'eau par une solution aqueuse d'azoture de sodium 5.10^{-2} M. Puis l'air dépourvu de gaz carbonique est fourni en présence de lumière après une heure trente.

- Résultats.

La lumière et l'air dépourvu de gaz carbonique provoquent l'ouverture des stomates de F_2 alimentée en eau et de F_3 non sectionnée. Par contre l'ouverture est pratiquement inhibée chez F_1.

242-2. Inhibition du mouvement de fermeture.

- Conditions de l'expérimentation.

Dans l'expérience décrite figure 55 on fait ouvrir les stomates en présence de lumière et d'air contenant $1,5.10^{-4}$ de gaz carbonique.

Le pétiole de F_1, F_2, F_3 une fois sectionné est immédiatement immergé dans l'eau (SPI). Lorsque le degré d'ouverture initial est à nouveau atteint on maintien le degré d'ouverture en fournissant de l'azote qui inhibe le mouvement des stomates. Ceci nous permet de retourner à l'obscurité sans changement d'ouverture stomatique. Ce degré d'ouverture élevé permet une bonne absorption de la solution inhibitrice d'azoture de sodium 5.10^{-2} M fournie à F_2. Après une heure dans ces conditions on remplace la solution inhibitrice par l'eau puis on fournit l'air de même teneur en gaz carbonique.

- Résultats.

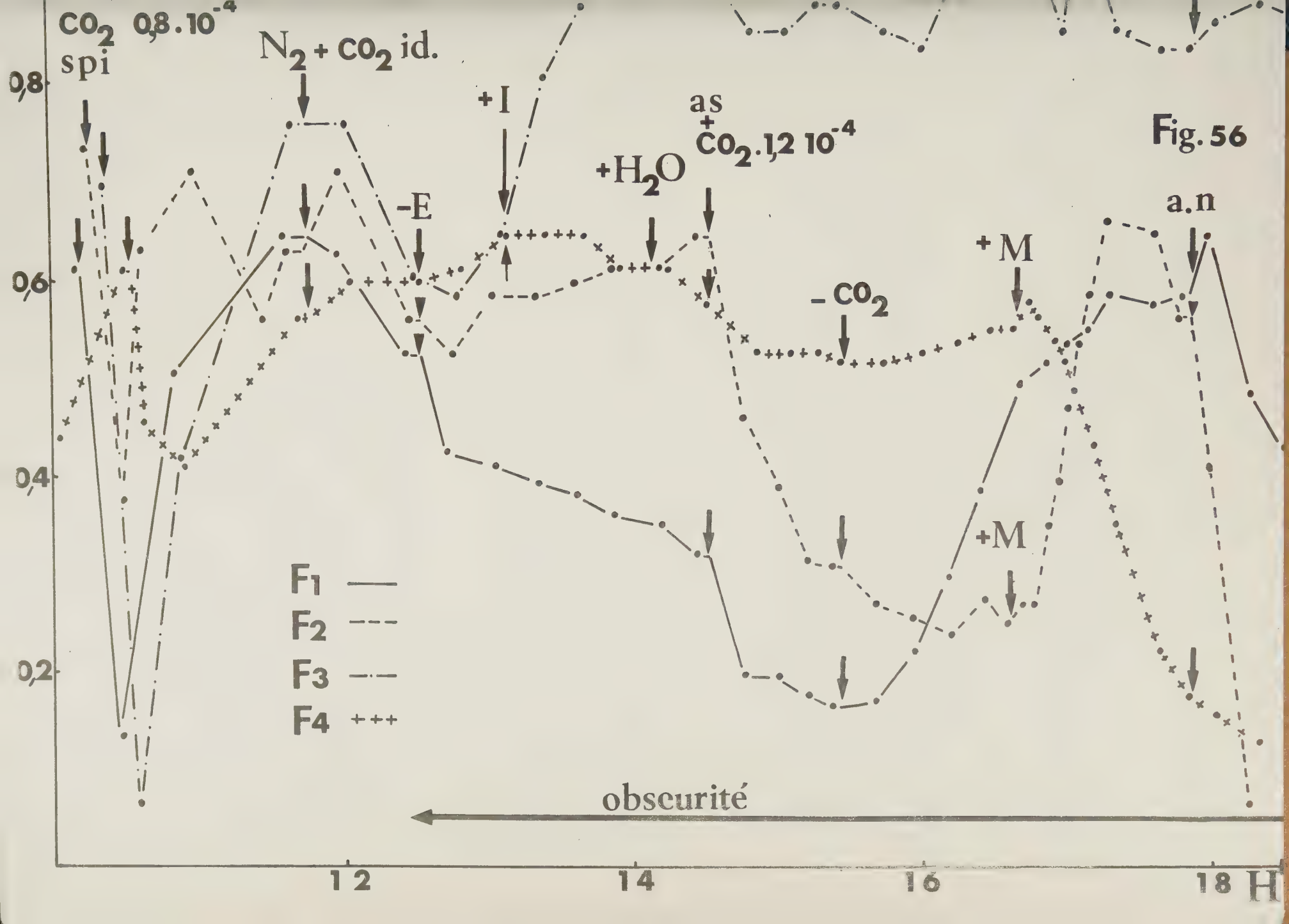
Les stomates de F_1 et F_3 se ferment aussitôt que l'oxygène est fourni par contre la fermeture des stomates est inhibée pour F_2.

Fig. 56. Inhibition de l'ouverture et de la fermeture des stomates par l'i
doacétate de sodium.

+ I = fourniture d'une solution aqueuse d'iodoacétate de sodiu
5.10^{-2}M.

+ H_2O = retour du pétiole de la feuille traitée dans l'eau pure.

+ M = remplacement de la solution aqueuse par du mannitol conc


CO_2 spi
$0{,}8.10^{-4}$
$N_2 + CO_2$ id.
+I
as
+ CO_2 .1,2 10^{-4}
Fig. 56
$+H_2O$
-E
a.n
+ M
$- CO_2$
+M
F_1
F_2
F_3
F_4
0,8
0,6
0,4
0,2
obscurité
12
14
16
18 H

24-3. Effets de l'iodoacétate de sodium.

L'iodoacétate de sodium est également un inhibiteur classique de la respiration ; son action sur le mouvement des stomates est toutefois moins bien connue.

243-1. Conditions de l'expérimentation.

Dans l'expérience décrite figure 56 on a utilisé les mêmes conditions d'expériences que celles décrites figure 55. La solution d'iodoacétate de sodium (5.10^{-2} M) est fournie aux feuilles F_3 et F_4 pendant une heure. Toutefois dans la même expérience on cherche à faire ouvrir les stomates à nouveau par envoi d'air dépourvu de gaz carbonique. De plus, on remplace ultérieurement l'eau par du mannitol 0,5 M dans le cas de F_2 et F_4. On sait (fig. 52) qu'une solution de mannitol entraîne un mouvement d'ouverture temporaire puis de fermeture passif d'origine osmotique qui peut se dérouler en anaérobiose.

243-2. Résultats.

La fourniture d'air de teneur en CO_2 ($1,2.10^{-4}$) entraîne aussitôt une fermeture pour les deux feuilles témoins F_1 et F_2 pas de fermeture pour F_3 et F_4. Le mouvement de fermeture est donc inhibé. L'envoi d'air dépourvu de gaz carbonique entraîne une réouverture pour F_1 qui reste témoin. Le mannitol entraîne pour F_2 (non traitée) une ouverture temporaire suivie de fermeture. Pour F_4 (traitée) le mouvement d'ouverture temporaire très bref mais visible précède la fermeture. F_3 traitée puis alimentée en eau reste insensible aux variations des teneurs en gaz carbonique.

24-4. Discussion.

244-1. Effet de l'azoture de sodium.

Les effets de l'azoture sur diverses réactions enzymatiques ont été recensés par HEWITT et NICHOLAS (1963). Nous retiendrons essentiellement l'inhibition *in vitro* des oxydases terminales (cytochrome-oxydases) mais également des phosphorylations. L'inhibition du mouvement d'ouverture et de fermeture des stomates à l'obscurité vient donc confirmer les interprétations des expériences décrites précédemment (paragraphe 11-5.) qui montrent que le mouvement de *fermeture chez le Pelargonium comme le mouvement d'ouverture est actif*. Les critiques formulées dans l'introduction restent toutefois valables. Dans nos expériences, nous ignorons quelle est la concentration effective de l'inhibiteur au niveau des cellules. Nous constatons seulement l'inhibition. Une seconde critique très valable de cette expérience concerne la toxicité de l'inhibiteur. En effet, on peut craindre qu'une concentration trop forte soit toxique pour toutes les cellules et non seulement les cellules stomatiques, et que les effets observés ne traduisent pas directement une action sur les cellules stomatiques. On peut faire remarquer toutefois que les substances agissant au-dessus du seuil de toxicité entraînent une fermeture des stomates. Nous avons pu vérifier ce phénomène

en fournissant de l'air chargé de vapeurs ammoniacales ou acétiques. Dans les deux cas on obtient une fermeture des stomates ; or nous avons vu que la fermeture est inhibée également. L'azoture n'est donc pas probablement un inhibiteur spécifique du mouvement des stomates mais, la respiration étant inhibée, les mouvements actifs le sont également.

244-2. Effets de l'iodoacétate de sodium.

Les effets de l'iodoacétate de sodium sur le mouvement des stomates n'ont pas été étudiés à notre connaissance. D'après WEBB (1966) il inhibe surtout la glycolyse et les phosphorylations. Il réagit avec les groupements SH, ce qui suffit à lui conférer de multiples propriétés. Nous observons une égale inhibition du mouvement d'ouverture et de fermeture. La nature "active" du mouvement des stomates est donc une nouvelle fois confirmée.En effet, la fourniture d'une solution concentrée en mannitol qui, comme nous le savons, peut entraîner des mouvements d'origine osmotique en l'absence d'oxygène, entraîne bien également le même type de mouvement dans nos expériences pour la feuille traitée F_4 comme pour le témoin F_2.

Conclusion.

Malgré les difficultés d'utilisation des inhibiteurs, ainsi que de l'interprétation de leurs modes d'action, ils ont été étudiés de manière extensive car, outre les renseignements théoriques fournis sur le mécanisme du mouvement des stomates, ils ont été utilisés dans le but pratique de réduire la transpiration des plantes. Ils constituent à ce titre la part la plus importante des corps appelés "antitranspirants" dont l'étude est actuellement très activement menée.

Outre l'emploi des inhibiteurs, il nous a paru intéressant de rechercher les meilleurs conditions de fourniture des *effecteurs* des mouvements stomatiques en contrôlant si possible leur pénétration dans les cellules stomatiques. En effet, s'il semble généralement admis que le mouvement d'ouverture est actif, deux publications seulement à notre connaissance indiquent que le mouvement de fermeture le serait également FUJINO (1967) et nous mêmes LOUGUET (1968 a et b). FUJINO prouve directement le rôle de l'ATP et de l'adénosine triphosphatase dans le mouvement des stomates. Nous avions nous aussi cherché à lever l'inhibition du mouvement des stomates en anaérobiose en fournissant de l'ATP au pétiole ; malgré plusieurs expériences nous n'avons jamais obtenu de résultats positifs ; il est possible également que l'ATP ne puisse pas pénétrer dans les cellules stomatiques dans nos conditions expérimentales. FUJINO semble avoir réussi dans cette tentative.

- C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S -

RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Il faut préciser que la plupart de nos résultats n'ont pu être établis qu'à l'aide d'une méthode de mesure fine utilisant la diffusion de l'hydrogène à travers les feuilles. Celle-ci s'est révélée particulièrement adaptée à la mesure des faibles ouvertures stomatiques et a permis d'aborder la cinétique du mouvement des stomates. En outre, la mise au point d'un dispositif pour l'obtention de faibles pressions partielles en gaz carbonique a permis d'examiner les effets des variations de sa concentration à l'obscurité sur le mouvement des stomates.

A ce propos, il n'est pas inutile d'affirmer que ce mécanisme existe, non seulement chez le *Pelargonium X hortorum*, mais encore dans un grand nombre d'espèces. Aucun fait ne permet de considérer qu'il s'agit là d'un mécanisme "anormal". Au contraire, nous avons vérifié que les degrés et les vitesses d'ouverture à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique ne sont pas significativement différents des degrés et vitesses d'ouverture à la lumière en présence de gaz carbonique. Nous avons montré que les fortes concentrations en gaz carbonique au-dessus de 4% favorisaient l'ouverture des stomates ; la vitesse d'ouverture augmente avec la teneur en gaz carbonique jusqu'à des valeurs de l'ordre de 15%, la vitesse maximum obtenue étant comparable à celle observée pour des teneurs nulles en gaz carbonique.

L'étude des interrelations entre la lumière et le gaz carbonique aux faibles teneurs conduit à reconnaître d'une part des phases d'ouverture et de fermeture des stomates provoquées par les variations de la teneur en gaz carbonique et d'autre part le maintien du degré d'ouverture plus exigeant semble-t-il pour la lumière. Aux fortes teneurs en gaz carbonique l'interprétation des expériences conduit à envisager une action "directe" de la lumière indépendante du gaz carbonique.

L'examen des effets des conditions d'oxydation sur le mouvement des stomates a permis de montrer que chez le *Pelargonium X hortorum* au moins les mouvements d'ouverture et de fermeture provoqués par les variations de la teneur en gaz carbonique sont de type "actif" c'est-à-dire qu'ils exigent de l'oxygène. Pour certaines gammes de température et de pressions partielles d'oxygène, les vitesses d'ouverture sont significativement différentes des vitesses de fermeture ; ceci s'interprète par l'existence de mécanismes différents pour l'ouverture et la fermeture. A l'occasion de cette étude nous avons précisé la variabilité des vitesses des mouvements stomatiques et sou-

ligné la nécessité de l'analyse statistique dans l'interprétation des résultats.

Nous pensons avoir éclairé suffisamment la controverse à propos de l'explication des mouvements des stomates et des variations de la transpiration consécutifs aux sections du pétiole des feuilles. Nous avons pu établir la nature active ou passive de ces mouvements et montrer que les différents mécanismes invoqués *séparément* par les tenants de l'une ou l'autre des deux hypothèses en présence devaient intervenir en réalité *simultanément* mais avec des intensités différentes suivant les conditions expérimentales.

CONTRIBUTION A L'EXPLICATION DU MOUVEMENT DES STOMATES : DISCUSSION DES PRINCIPALES HYPOTHESES.

Dans l'hypothèse classique le gaz carbonique agit sur le mouvement des stomates en abaissant le pH des cellules stomatiques. Nous avons rappelé que les variations de la teneur en gaz carbonique de l'air ne peuvent rendre compte à elles seules de la diminution du pH observée, par contre, l'existence de réactions de carboxylation permettant la synthèse d'acides organiques semble très vraisemblable.

Les effets des fortes teneurs en gaz carbonique semblent *a priori* refuter l'interprétation classique du mode d'action du CO_2 ; en effet, aux fortes concentrations en CO_2 le pH devrait être encore plus bas et par conséquent les stomates devraient rester fermés ; or ils s'ouvrent d'autant plus rapidement que la teneur en CO_2 augmente jusqu'à la limite de 15%.

Le rôle du gaz carbonique pourrait s'interpréter de la manière suivante :
Le degré d'ouverture des stomates est la résultante de l'action simultanée de deux mécanismes, l'un responsable de l'ouverture et l'autre de la fermeture. Les très faibles teneurs en gaz carbonique ne pourraient permettre les carboxylations : le mécanisme d'ouverture prendrait l'avantage sur celui de fermeture ; les teneurs comprises entre 0,03% et 1 à 2% permettent les carboxylations, le mécanisme de fermeture l'emporte ; enfin de fortes teneurs en gaz carbonique pourraient conduire à une inhibition des carboxylations, c'est-à-dire finalement inhiber le mécanisme de fermeture, et par voie de conséquence entraîner l'ouverture. Dans ces conditions la découverte des premiers produits formés par carboxylation serait d'une importance fondamentale dans l'explication du mouvement des stomates.

L'hypothèse du rôle direct de la lumière émise à la suite de la reconnaissance de l'efficacité supérieure des radiations bleues dans l'ouverture des stomates peut interpréter également certaines de nos expériences en présence de lumière et de fortes teneurs en CO_2. LEVITT (1967) a recusé les principales objections présentées contre la théorie classique à l'exception du mode d'action du gaz carbonique. Nous sommes en accord avec l'auteur en ce qui concerne le rôle des réactions de carboxylation et nous avons confirmé expérimentalement son hypothèse de l'intervention de mécanismes différents pour l'ouverture et la fermeture ; quant à savoir quel est le rôle véritable des transformations amidon - sucres réducteurs, l'incertitude règne encore actuellement et nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage de MEIDNER et MANSFIELD (1958) pour la discussion de ce point.

La théorie du rôle du glycolate formulée par ZELITCH (1963) ne rend pas compte également de tous les faits connus. En effet, nous avons obtenu une ouverture à l'obscurité en air dépourvu de gaz carbonique et en présence d' α-hydroxysulfonates inhibiteurs de la glycolate oxydase. Comme MEIDNER et MANSFIELD nous estimons que ces substances sont d'abord des inhibiteurs de la photosynthèse et, par voie de conséquence, ils entraînent une augmentation des teneurs en gaz carbonique des cellules et provoquent la fermeture des stomates.

En ce qui concerne le rôle des cations dans l'ouverture des stomates il faut souligner que l'afflux de cations nôtamment K^+ ne se produit qu'en présence de lumière et pourrait éventuellement rendre compte d'un rôle direct de la lumière. Il faut remarquer également que les stomates de lambeaux d'épiderme flottant sur des milieux enrichis en K^+ ne peuvent se fermer à l'obscurité et en présence de gaz carbonique ce qui introduit quelques doutes sur l'importance de ce mécanisme dans les conditions naturelles.

Il nous semble donc, en résumé, qu'il existe certainement plusieurs mécanismes permettant d'expliquer le mouvement des stomates. Le fait qu'aucun des mécanismes envisagés ne puisse expliquer la totalité des faits observés ne suffit pas,à notre sens, à leur dénier tout rôle dans le mouvement des stomates. Nous pensons que le problème est plutôt de savoir si telle ou telle espèce possède l'un des mécanismes supposés et pas les autres, ou si, suivant les conditions expérimentales, un type de mécanisme l'emporte rendant inopérant les autres. En outre certaines propriétés des mouvements des stomates semblent traduire l'intervention de phénomènes de régulation dont l'existence directe reste évidemment à démontrer.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

MEIDNER et MANSFIELD (1968) concluent leur ouvrage de la manière suivante :

" *For the future, only one thing is really clear : research into the stomatal mechanisms is going to become increasingly difficult. All the resources of modern plant physiology are likely to be called upon and many specially devised techniques besides* ".

Il est vrai qu'on ne peut se contenter d'interprétations purement mécaniques et qu'il faut aborder le problème des mouvements stomatiques non seulement sous l'angle physiologique mais également *biochimique*. En effet, les progrès lents de nos connaissances sur les mécanismes du mouvement des stomates sont liés à l'impossibilité d'isoler les cellules stomatiques en quantité suffisante afin de les soumettre à l'analyse biochimique. Les approches expérimentales sont donc le plus souvent indirectes. Par contre la cytologie permet une approche directe intéressante comme le confirment les récentes expériences concernant le rôle des cations dans l'ouverture des stomates. Ce type d'expériences n'est toutefois réalisable qu'avec des lambeaux d'épidermes isolés, ce qui éloigne des conditions normales de fonctionnement des cellules stomatiques. Il serait utile que des recherches soient entreprises sur les modifications cytoplasmiques accompagnant l'ouverture et la fermeture des stomates à l'aide des techniques de la microscopie électronique.

En ce qui concerne les méthodes de mesure du degré d'ouverture des stomates, il semble que l'on soit arrivé, notamment avec les poromètres utilisant la diffusion des gaz, à une précision suffisante autorisant des études de la cinétique d'ouverture et de fermeture des stomates.

Pour sortir de l'impasse il nous paraît nécessaire de s'attaquer de manière directe au problème biochimique. Dans un premier temps, essayer de mettre au point des techniques de séparation des épidermes qui n'altèrent pas les cellules stomatiques ou bien envisager des cultures d'épidermes ? Ensuite, la sensibilité des techniques d'analyse biochimiques telles que la chromatographie en phase gazeuse assortie de la détection de la radioactivité des solutés effluents nous paraît autoriser beaucoup d'espoirs pour les recherches ultérieures. Nous avons entrepris récemment cette étude notamment à propos des acides organiques qui semble-t-il doivent jouer un rôle fondamental dans le mouvement des stomates.

Cependant, les renseignements sur les mécanismes des mouvements stomatiques fournis par l'analyse biochimique devront être constamment vérifiés par l'analyse physiologique. Nous pensons, en définitive, que nos connaissances sur ces mécanismes ne pourront progresser que grâce aux recherches complémentaires menées conjointement sur la physiologie et la biochimie des stomates.

oooooooooooo

- B I B L I O G R A P H I E -

ALLERUP S., 1959 - Transpiration and water movement in young wheat plants. *Physiol. Plant., 12, 907-16.*

ALLERUP S., 1960 - Transpiration and stomata movements in young barley plants. *Physiol. Plant., 13, 112-9.*

ASHBY E., 1931 - Comparaison of two methods of measuring stomatal aperture. *Plant Physiol., 6, 715-9.*

ALWIM P. de T., 1949 - Studies on the mechanism of stomatal behaviour. *Amer. J. Bot., 36, 781-91.*

ALWIM P.de T., 1965 - A new type of porometer for measuring stomatal opening and its use in irrigation studies. *Méthodologie de l'écophysiologie végétale. Actes du Colloque de Montpellier. Recherches sur la zone aride, XXV, 325-9.*

BARRS H.D. et KLEPPER B., 1968 - Cyclic variations in plant properties under constant environmental conditions. *Physiol. Plant., 21, 711-30.*

BEEK J., 1962 - Measurement of gaseous diffusion through porous materials. *Ind. Engin. Chem. (Process design), 1, 45-7.*

BIERHUIZEN J.F., SLATYER R.O., ROSE G.W., 1965 - A porometer for laboratory and field operation. *J. Exptl. Bot., 16, 182-91.*

BLACKMAN F.F., 1895 - On the paths of gaseous exchange between aerial leaves and the atmosphere. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B., 186, 503-62.*

BROWN H.T. et ESCOMBE F., 1900 - Static diffusion of gases and liquids in relation to the assimilation of carbon and translocation in plants. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 193, 223-91.*

BRUN W.A., 1961 - Photosynthesis, transpiration of banana leaves as affected by severing the vascular system. *Plant Physiol., 36, 577-80.*

BRUN W.A., 1965 - Rapid changes in transpiration in banana leaves. *Plant Physiol., 40, 797-802.*

BUSCALIONI L. et POLLACCI G., 1901 - Ulteriori ricerche sull applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici delle piante ad in particolar modo della transpirazione vegetale. *Atti. Inst. Bot. ecc. Pavia, 2, ser. 7.*

CARLIER G., 1964 - L'émission de gaz carbonique par les feuilles sur pied. Etude critique et effets des variations de l'état hydrique et de la séparation. *Rev. Gén. Bot., 71, 401-528.*

CARMAN P.C., 1956 - Flow of gases through porous media. *A treatise. Butterworths London ed.*

COME D., 1960 - Contribution à l'étude de la perméabilité du tégument des graines à l'oxygène et au gaz carbonique.*Diplôme d'études sup. Sci. Nat. Fac. Sciences de Paris.*

DARWIN F., 1898 - Observations on stomata. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, B 190, 531-621.*

DARWIN F. et PERTZ D.F.M., 1911 - On a new method of estimating the aperture of stomata. *Proc. Roy. Soc. London, B 84, 136-54.*

DECKER J.P. et WIEN J.D., 1960 - Transpirational surges in Tamarix and Eucalyptus as measured with an infrared gas analyser. *Plant. Physiol., 35, 340-3.*

DEVAUX H., 1898 - "Echanges gazeux des tiges ligneuses". *Ext. Proc. verb. Soc. Sc. Phys. et Nat. Bordeaux, 61, 785.*

FISCHER R.A., 1968 - Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. I. Responses to light and to CO_2 free air. *Plant. Physiol., 43, 1947-52.*

FISCHER R.A. and HSIAO T.C., 1968 - Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. *Plant. Physiol., 43, 1953-8.*

FRANCO C.M. et MAGALHÃES A.C., 1963 - Inconveniencias do método das pesagens rapidas para a medida da transpiraçao. *Phyton., 20, 87-96.*

FREUDENBERGER H., 1940 - Die Reaktion der Schliesszellen auf Kohlensäure und Sauerstoff Entzug. *Protoplasma, 35, 15-54.*

FUJINO M., 1967 - Role of adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in stomatal movement. *Sc. Bull. Fac. Educ., Nagasaki Univ., 18, 1-47.*

GAASTRA P., 1959 - Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature and stomatal diffusion resistance. *Meded. Landbouwhogesch. Wageningen, 59, 1-68.*

GALE J., POLJAKOFF-MAYBER A. and KAHANE I., 1967 - The gas diffusion porometer technique and its application to the measurement of leaf mesophyll resistance. *Israel J. Bot., 16, 187-204.*

GAUHL E. and BJÖRKMAN O., 1969 - Simultaneous measurements on the effect of oxygen concentration on water vapour and carbon dioxide exchange in leaves.*Planta, 88, 187-91.*

GREGORY F.G. and PEARSE H.L., 1934 - The resistance porometer and its application to the study of stomatal movement. *Proc. Roy. Soc. Lond., B 114, 477-93.*

GREGORY F.G. and ARMSTRONG J.L., 1937 - The diffusion porometer. *Proc. Roy. Soc. Lond., B, 121, 27-42.*

HABERLANDT G., 1905 - Die Lichtsinnesorgane der Laubblätter. *Leipzig.*

HARTSUIJKER K., 1935 - Kritische Bemerkungen über einige der wichtigsten Methoden zur Ermittlung des Oeffnungs-zustandes der Spaltöffnungen. *Trav. Bot. Neerl., 32, 516-42.*

HEATH O.V.S., 1948 - Control of stomatal movement by reduction in the normal carbon dioxide content of the air. *Nature, 161, 179-81.*

HEATH O.V.S., 1950 - Studies in stomatal behaviour. V- The role of carbon dioxide in the light response of stomata. Part 1. Investigation of the cause of abnormally wide stomatal opening within porometer cups. *J. exptl. Bot.,1, 29-62.*

HEATH O.V.S., 1959 - The water relations of stomatal cells and the mechanism of stomatal movement. *In plant Physiology - a treatise ed. Steward, F.C. - Vol. II, p. 193-250. Academic Press, New York.*

HEATH O.V.S., 1963 - Rapid changes in transpiration in plants. *Nature, 200, 265-6.*

HEATH O.V.S., MANSFIELD T.A., and MEIDNER H., 1965 - Light induced stomatal opening and the postulated role of glycollic acid.*Nature, 207, 960-2.*

HEATH O.V.S. and MEIDNER H., 1957 - Midday closure of stomata. Effects of carbon dioxide and temperature on stomata of *Allium cepa L. Nature, 180, 181-2.*

HEATH O.V.S. and MEIDNER H., 1961 - The influence on water strain on the minimum intercellular space carbon dioxide concentration Γ and stomatal movement in wheat leaves. *J. exptl. Bot., 12, 226-42.*

HEATH O.V.S. and MILTHORPE F.L., 1950 - The role of carbon dioxide in the light response of stomata. II- Preliminary experiments on the interrelations of light intensity, carbon dioxide concentration and rate of air flow in controlling the movement of wheat stomata. *J. exptl. Bot., 1, 227-43.*

HEATH O.V.S. and ORCHARD B., 1956 - Studies in stomatal behaviour. VII- Effects of anaerobic conditions upon stomatal movement. A test of Williams' hypothesis of stomatal mechanism. *J. exptl., Bot., 7, 313-25.*

HEATH O.V.S. and ORCHARD B., 1957 - Temperature effects on the minimum intercellular space carbon dioxide concentration.*Nature, 180, 180-1.*

HEATH O.V.S. and RUSSEL J., 1951 - The Wheatstone bridge porometer. *J. exptl. Bot., 2, 111-6.*

HEATH O.V.S. and RUSSEL J., 1954 (a) - Studies in stomatal behaviour. VI - An investigation of the light responses of wheat stomata with the attempted elimination of control by mesophyll. Part. 1- Effect of light independent of carbon dioxide and their transmission from one part of the leaf to another. *J. exptl. Bot., 5, 1-15.*

HEATH O.V.S. and RUSSEL J., 1954 (b) - Idem. Part2- Interactions with external carbon dioxide, and general discussion. *J. exptl.Bot.,5,269-92.*

HELLER R., 1968 - Manuel de statistique biologique. *Gauthier-Villars éditeur, Paris, p. 155.*

HEWITT E.J. and NICHOLAS D.J.D., 1963 - Cations and anions : inhibitions and interactions in metabolism and enzyme activity. In metabolic inhibitors . *Eds. HOCHSTER R.M. and QUASTEL J.H., Vol II, p. 311-436. Academic Press New-York.*

HOLMGREN P., JARVIS P.G. and JARVIS M.S., 1965 - Resistances to carbon dioxide and water vapour transfer in leaves of different plant species. *Physiol. Plant., 18, 557-73.*

HOOGSHAGEN J., 1955 - Diffusion in porous catalysts and adsorbents. *Ind. Eng. Chem., 47, 906-13.*

IWANOFF L., 1928 - Zur Methodik der Transpirationsbestimmung am Standort. *Ber. deutsch Bot. Ges., 46, 306-10.*

JEFFREYS H., 1918 - Some problems of evaporation. *Phil. Mag. 35, 270-80.*

JOST V.W., 1952 - Diffusion in solids, liquids, gases. *A treatise. Acad. Press. Inc. Pub. New-York.*

KETELLAPPER H.J., 1963 - Stomatal physiology. *Ann. Rev. Plant. Physiol.,14, 249-70.*

KUIPER P.J.C., 1961 - The effects of environmental factors on the transpiration of leaves with special references to stomatal light responses. *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen, 61, 1-49.*

KUIPER P.J.C., 1964 - Dependence upon wavelenght of stomatal movement in epidermal tissue of *Senecio odoris*. *Plant. Physiol., 39, 952-5.*

LAIDLAW C.G.P. and KNIGHT R.C., 1916 - A description of a recording porometer and a note on stomatal behaviour during wilting. *Ann. Bot. London, 30, 47-56.*

LEE R. and GATES D.M., 1964 - Diffusion resistance in leaves as related to the stomatal anatomy and micro structure. *Amer. Jour. Bot., 51, 963-75.*

LEMEE G., 1956 - Aspects écologiques de la régulation stomatique de la transpiration. *Bull. Soc. Franc. Phys. Veg., 2, 29 - 42.*

LE SAINT A.M., 1957 - Mise en évidence d'une chute de la perméabilité aux gaz des tissus de pomme pendant le gel à partir de la cessation de la surfusion. *Rev. Gen. Bot., 64, 334.*

LEVITT J., 1967 - The mechanism of stomatal action. *Planta, 74, 101-18.*

LLOYD F.E., 1908 - The physiology of stomata. *Publ.Carnegie Instn, Wash., 82, 1-142.*

LOTFIELD J.V.C., 1921 - The behaviour of stomata. *Publ. Carnegie Instn., Wash., 314, 1-104.*

LOUGUET P., 1962 - Sur une méthode d'étude du mouvement des stomates utilisant la diffusion de l'hydrogène à travers les feuilles. Actes du Colloque International sur la Méthodologie de l'Ecophysiologie végétale de Montpellier, *Recherches sur la zone aride, XXV, 307-16.*

LOUGUET P., 1965 - Influence de la teneur en gaz carbonique de l'air sur le mouvement des stomates à l'obscurité. *Physiol. Vég., 3, 345-53.*

LOUGUET P., 1968 a - Influence de l'anaérobiose sur le mouvement des stomates à l'obscurité chez le *Pelargonium X hortorum*. *Physiol. Vég., 6, 83-92.*

LOUGUET P., 1968 b - Influence de la section du pétiole sur le mouvement des stomates de *Pelargonium X hortorum* à l'obscurité : rôle de l'eau en conditions aérobies et anaérobies. *Physiol. Vég., 6, 337-49.*

LUDLOW M.M., 1970 - Effect of oxygen concentration in leaf photosynthesis and resistance to carbon dioxide diffusion. *Planta, 91, 285-90.*

MANSFIELD T.A., 1965 - Glycollic acid metabolism and the movement of stomata. *Nature, 205, 617-8.*

MANSFIELD T.A. and MEIDNER H., 1966 - Stomatal opening in light of different wavelenghts : effects of blue light independent of carbon dioxide concentration. *J. Exptl. Bot., 17, 510-21.*

MARCELLIN P., 1958 - Voies et mécanismes des échanges gazeux des fruits . *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 4, 17-25.*

MARCELLIN P., 1966 - Etude de la diffusion des gaz à travers les pores des organes végétaux (cas d'un fruit massif, la pomme).*Colloques internationaux du CNRS (Phénomènes de transport avec changement de phase dans les milieux poreux ou colloîdaux), 160, 1-16.*

MEIDNER H., 1955 - The determination of paths of air movement in leaves. *Physiol. Plant., 8, 930-5.*

MEIDNER H., 1965 - Stomatal control of transpirational water loss. In the state of water in living organisms. *symp. Soc. Exptl. Biol., XIX, 185-204.*

MEIDNER H. and HEATH O.V.S., 1959 - Studies in stomatal behaviour. Stomatal responses to temperature and carbon dioxide concentration in *Allium cepa L.* and their relevance to midday closure. *J. Exptl. Bot., 10, 206-19.*

MEIDNER H. and HEATH O.V.S., 1963 - Rapid changes in transpiration in plants. *Nature, 200, 283-4.*

MEIDNER H. and MANSFIELD T.A., 1968 - Physiology in stomata. *A treatise 179p. Mc GRAW-HILL. London.*

MILTHORPE F.L. and SPENCER E.J., 1957 - Experimental studies of the factors controlling transpiration. III- The interrelations between transpiration rate, stomatal movement and leafwater content.*J. Exptl. Bot., 8, 413-37.*

MILTHORPE F.L. and PENMAN H.L., 1967 - The diffusive conductivity of the stomata of wheat leaves. *J. Exptl. Bot., 18, 422-57.*

MOHL H. VON, 1856 - Welche Ursachen bewirken die Erweiterung und Verengung der Spaltöffnungen ? *Botan. Z. 14, 697-704, 713-20.*

MOLISCH H., 1912 - Das Offenund Geschlossensein der Spaltöffnungen, Veranshaulicht durch eine neue Method (Infiltrations methode). *Z. Bot. 4, 106-22.*

MORESHET S.et STANHILL G., 1968 - A radioactive tracer technique for the direct measurement of the diffusion resistance of stomata.*J. Exptl. Bot. 19, 460-7.*

MOURAVIEFF I., 1951 - Action de l'hydratation des cellules épidermiques sur l'appareil stomatique. *C.R. Acad. Sci., 232, 1507-9.*

MOURAVIEFF I., 1956 - Action du CO_2 et de la lumière sur l'appareil stomatique séparé du mésophylle II. Expériences avec les stomates maintenus sur les milieux complexes. *Botaniste (Paris), 11,195-212.*

MOURAVIEFF I., 1958 - Action de la lumière sur la cellule végétale. *Bull. Soc. Bot. Fr., 105, 467-75.*

MOURAVIEFF I., 1959 - Action de l'azoture de sodium sur les mouvements d'ouverture et de fermeture des stomates. C.R. *Acad. Sci., 248, 3336-7.*

MOURAVIEFF I., 1963 - Ouverture de l'appareil stomatique et photosynthèse des feuilles isolées de *Veronica beccabunga L.* en lumière monochromatique de 512, 526, 546 et 660 m µ. *Annales des Sciences Naturelles Botanique Paris. IV, p. 225-32.*

MOURAVIEFF I., 1966 - Recherches sur les inhibiteurs des mouvements stomatiques. Action de l' α-hydroxymethanesulfonate de sodium sur les stomates de *Veronica beccabunga L. Bull. Soc. Lin. Lyon, 5, 241-6.*

NADEL M. 1935 - On the influence of various liquid fixatives on stomatal behaviour. *Palestine J. Botany Hort. Sci., 1, 22-42.*

NADEL M., 1938 - Critique de la méthode de fixation des stomates par l'alcool (méthode de Lloyd). *Thèse Faculté des Sciences de Paris.*

PARCEVAUX S. de, 1964 - Calcul de la résistance stomatique et mesure de la résistance dans la couche limite grâce aux analogies électriques : cas de la vapeur d'eau. *Wiss. Zeit. Leipzig, 4, 877-80 .*

PENMAN H.L., 1942 - Theory of porometer used in the study of stomatal movements in leaves. Proc. Roy. Soc. London, *B 130, 416-34*

PISEK A., 1935 - Zur Beobachtung des Öffnungszustandes der Spalten am *Lebenden. Blatt. Ber. dtsch. Bot. Ges., 53, 624-9.*

RASCHKE K., 1967 - Erweiterung der Spaltöffnungen Von *Vicia faba* durch. *Stickstoff. Naturwiss, 54, 73.*

RASCHKE K., 1970 - Temperature dependance of CO_2 assimilation and stomatal aperture in leaf sections of *Zea mays. Planta, (Berl.), 91, 336-63.*

RUFELT H., 1963 a - Rapid changes in transpiration in plants. *Nature, 197, 985-6.*

RUFELT H., 1963 b - id, 200, 191-2.

RUFELT H., 1963 c - id, 200, 284.

SAMPSON J., 1961 - A method of replication dry or moist surfaces for examination by light microscopy. *Nature, 191, 932-3.*

SAWHNEY B.L., and ZELITCH I., 1969 - Direct determination of potassium ion accumulation in guard cell in relation to stomatal opening in light.*Plant. Physiol., 44, 1350-4.*

SAYRE J.D., 1926 - Physiology of stomata of *Rumex patientia. Ohio J. Sc. 26, 233-66.*

SCARTH G.W., 1932 - Mechanism of the action of light and other factors on stomatal movement. *Plant. Physiol., 7, 481-504.*

SCARTH G.W., WHYTE J. and BROWN A., 1933 - On the cause of night opening of stomata. *Trans. Roy. Soc. Canada. Sect.V, 27, 115-7.*

SCARTH G.W. and SHAW M., 1951 - Stomatal movement and photosynthesis in Pelargonium. II- Effects of water deficit and of chloroform : photosynthesis in guard cells. *Plant. Physiol., 26, 581-97.*

SIERP H. and SEYBOLD A., 1929 - Weitere Untersuchungen über die Verdunstung aus multiperforaten Folien mit kleinsten Poren.*Planta, 9, 246-69.*

SLATYER R.O., JARVIS P.G., 1966 - Gaseous diffusion porometer for continous measurement of diffusive resistance of leaves. *Science, 151, 574-5.*

SPANNER D.C. and HEATH O.V.S., 1951 - Experimental studies of the relation between carbon assimilation and stomatal movement. II - The use of the resistance porometer in estimating stomatal aperture and diffusive resistance. Part.2. Some sources of error in the use of the resistance porometer and some modification of its design. *Ann. Bot., London, N.S. 15, 319-31.*

STAHL E., 1894 - Einige Versuche über Transpiration und Assimilation. *Bot. Zeit., 52, 117-46.*

STÅLFELT M.G., 1928 - Die Abhängigkeit der photischen Spaltöffnungsreaktionen Von der Temperatur . *Planta (Berl.), 6, 183.*

STÅLFELT M.G., 1929. a - Neuere Methoden zur Ermittlung des Öffnungszustandes der stomata." *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden" E. Abderhalden ed, Abt. 11, Teil 4, 167-92. Urban and Schwarzenberg, Berlin and Vienna.*

STÅLFELT M.G., 1929 b - Die Abhängigkeit der Spaltöffnungsreaktionen Von der Wasser bilanz. *Planta, 8, 287.*

STÅLFELT M.G., 1955 - The stomata as a Hydrophotic Regulator of the Water deficit of the plant.*Physiol. Plant., 8, 572-93.*

STÅLFELT M.G., 1956 - Die stomatäre Transpiration und die Physiologie der Spaltöffnungen. In Handbuch der Pflanzen-physiologie, III- 351-426. *Springer Verlag, Berlin.*

STÅLFELT M.G., 1957 - The water out put of the guard cells of the stomata. *Physiol. Plant., 10, 752-73.*

STÅLFELT M.G., 1962 - The effect of Temperature on opening of the stomatal cells. *Physiol. Plant., 15, 772-9*

STÅLFELT M.G., 1966 - The role of the epidermal cells in the stomatal movements. *Physiol. Plant., 19, 241-56.*

STEFAN J., 1881 - Ueber die Verdampfung aus einem kreisförmig oder elliptish begienzten Becken. *Sitz Akad. Wiss. Wien. II, 83, 943-54.*

STEWARD F.C. and SUTCLIFFE J.F., 1959 - Plants in relation to inorganic salts. *In Plant Physiology, a treatise by F.C. STEWARD vol II. Academic Press New York and London, 335-50.*

STREBEYKO P., 1965 - The theory of porometer. *Physiol. Plant., 18, 725-9.*

TING I.P. and LOOMIS W.E., 1963 - Diffusion through stomates.*Amer. Jour. Bot., 50, 866-72.*

TING I.P. and LOOMIS W.E., 1965 - Further studies concerning stomatal diffusion. *Plant. Physiol., 40, 220-8.*

VAN BAVEL C.H.M., NAKAYAMA F.S. and ERRLER W.L., 1965 - Measuring transpiration resistance of leaves. *Plant. Physiol., 40, 535-40.*

VANETTI - Communication personnelle.

VERDUIN J. and LOOMIS W.E., 1944 - Absorption of carbon dioxide by maize. *Plant. Physiol., 19, 278-93.*

VERDUIN J., 1949 - Diffusion through multiperforate septa. In photosynthesis in plants.*J. Frank. and W.E. LOOMIS, ed. Iowa state College Press, Amer., Iowa, 95-112.*

WALKER D.A. and ZELITCH I., 1963 - Some effects of metabolic inhibitors, temperature and anaerobic conditions on stomatal movement.*Plant Physiol. 38, 390-6.*

WEATHERLEY P.E., 1966 - A porometer for use in field.*New Phytol., 65, 376-87.*

WEBB J.L., 1966 - In "Enzymes and Metabolic inhibitors" vol III. *Academic Press New York and London.*

WILLIAMS W.T., 1950 - Studies in stomatal behaviour IV. The water relation of the epidermis. *J. Exptl. Bot., 1, 114 - 31.*

WILLIAMS W.T., 1954 - A new theory of the mechanism of stomatal movement. *J. Exptl. Bot., 5, 343-52.*

WILLIS A.J., YEMM E.W. and BALASUBRAMANIAM S., 1963 - Transpiration phenomena in detached leaves. *Nature, 19, 265-6.*

WILLMER C.M. and MANSFIELD T.A., 1969 - Active cation transport and stomatal opening : a possible physiological role of sodium ions. *Z. Planzen Physiol., 61, 398.*

WILLMER C.M. and MANSFIELD T.A., 1970 - Further observations of cation stimulated stomatal opening in isolated epidermis. *New Phytol., 69, 639-45.*

WILSON C.C., 1948 - The effect of some environmental factors on the movements of guard cells. *Plant. Physiol., 23, 5-37.*

WYLIE R.B., 1943 - The role of the epidermis in foliar organization and its relations to minor venation. *Amer. Jour. Bot., 30, 273-80.*

YEMM E.W. and WILLIS A.J., 1954 - Stomatal movements and changes of carbohydrates in leaves of *Chrysanthemum maximum. New Phytol., 53, 373-96.*

ZELITCH I., 1961 - Biochemical control of stomatal opening in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 1101-8*

ZELITCH I., 1963 - The control and mechanism of stomatal movement. *In "stomata and water relations in plants", Conn. Agr. Exptl. Sta. New Haven Bull., 664 , 18-42.*

ZELITCH I., 1965 - Environmental and biochemical control of stomatal movement in leaves. *Biol. Rev., 40, 463-82.*

ZELITCH I., 1969 - Stomatal control. *Ann. Rev. Plant. Physiol., 20, 329-50.*

- A N N E X E -

DETERMINATION DE LA VALEUR MINIMALE DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE DU Q_{10} : RAPPORT DE LA VITESSE D'OUVERTURE A 20°C SUR LA VITESSE D'OUVERTURE A 10°C.

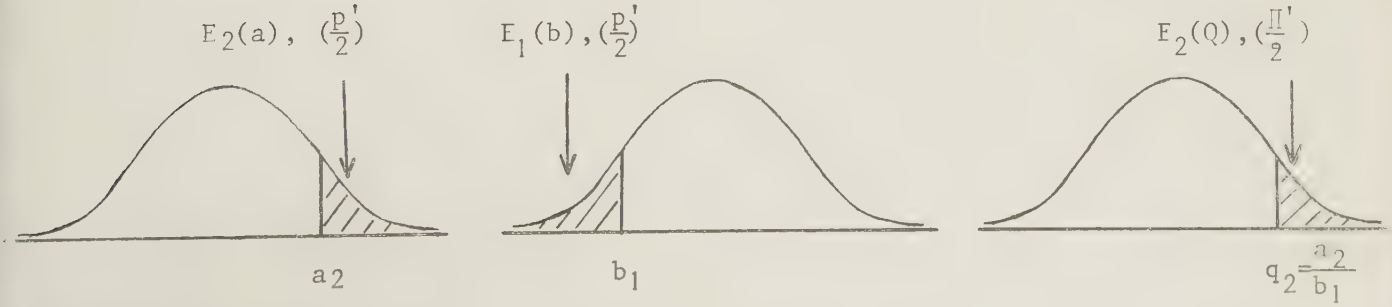
En admettant que la variable A (données expérimentales : vitesses d'ouverture à 20°C) et la variable B (vitesses à 10°C) suivent la loi normale et soient indépendantes, on peut déterminer la valeur *minimum* de l'intervalle de confiance de $Q = \frac{A}{B}$ de la manière suivante :

Considérons la valeur a_2 qui borne inférieurement l'ensemble $E_2(a)$ des valeurs a de A supérieures à la moyenne telle que $Pr\ (A=a) \leqslant \frac{p'}{2}$ et la valeur b_1 qui borne supérieurement l'ensemble $E_1(b)$ des valeurs b de B inférieures à la moyenne telle que $Pr\ (B=b) \leqslant \frac{p'}{2}$.

Tous les quotients $q = \frac{a}{b}$ obtenus à partir de ces deux ensembles ont une valeur $q \geqslant q_2$ avec

$$q_2 = \frac{a_2}{b_1}$$

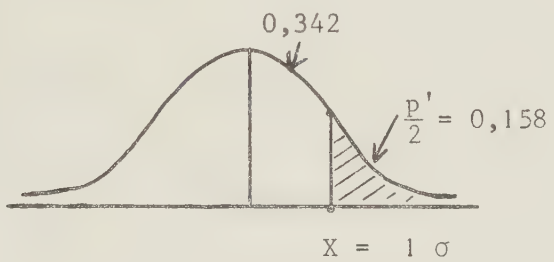
Si dans la distribution de Q je considère l'ensemble des valeurs $E_2(Q)$ de probabilité Π'_2 des valeurs $q \geqslant q_2$ tous les couples $E_2(a).E_1(b)$ appartiennent à $E_2(Q)$, mais $E_2(Q)$ contient aussi des quotients obtenus en dehors de ces couples.



On a donc $\frac{\Pi'}{2} > \frac{p'^2}{4}$. Donnons à p' une valeur telle que $\frac{p'^2}{4} = \frac{0,05}{2}$, donc $p' = \sqrt{0,10} = 0,316$. J'ai donc $\frac{\Pi'}{2} > \frac{0,05}{2}$ donc q_2 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance de Q au seuil 0,05.

Par un raisonnement symétrique en posant $q_1 = \frac{a_1}{b_2}$ nous sommes sûrs que $q_2 q_1$ sont à l'intérieur de l'intervalle de confiance de Q donc que cet intervalle déborde $q_2\ q_1$.

Or dans la distribution normale la probabilité $p' = 0,316$ (donc $\frac{p'}{2} = 0,158$) correspond à la valeur de la variable $X = 1\ \sigma$



Dans la distribution de A, l'intervalle de confiance à p0,05 vaut 16, $1,96\ \sigma = 16$ donc $\sigma \simeq 8$, pour B $1,96\ \sigma = 17$ donc $\sigma = 8,6$ les limites sont alors

$$a_2 = 108 \qquad a_1 = 92$$

$$b_2 = 66,5 \qquad b_1 = 49,5$$

D'où les valeurs limites de Q

$$\frac{92}{66,5} < Q < \frac{108}{49,5}$$

$$1,4 < Q < 2,1$$

nie de Paris

ITE de PARIS VI
nt Bernard - Paris 5

DE LA SCOLARITE
seignements du 3e Cycle

.25 et 325.12.21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'ETAT
THESE DE : SCIENCES NATURELLES

NOM : Monsieur LOUGUET
Prénoms : Philippe
né le 24 Février 1938 à Tours Dépt : Indre et Loire

1ère THESE : "Recherches sur les mécanismes des mouvements stomatiques du pélargonium X Hortorum particulièrement à l'obscurité et sous l'action du gaz carbonique

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

ACADEMIE DE PARIS
UNIVERSITE DE PARIS
VI

Vu et Approuvé
PARIS, le 26 Juillet 1971
Le Président
de l'Université de PARIS VI